UNIVERSITE D'ALGER
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1968 — N°

LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE SON INTÉRÊT DANS LA RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX

THESE

pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le 13 Juillet 1968

par

Mme Fadila BOULAHBAL

Née le 16 Septembre 1941 à Khenchela

Interne des Hôpitaux d'Alger

Membres du Jury :

MM.	**T. HADDAM,** Maître de Conférence Agrégé (Chirurgie Thoracique)	Président
	P. COLONNA, Maître de Conférence Agrégé (Hématologie)	Juges
	J. GROSSET, Maître de Conférence Agrégé (Bactériologie)	
	D. LARBAOUI, Maître de Conférence Agrégé (Pneumo-Phtisiologie)	

LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE SON INTÉRÊT DANS LA RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX

UNIVERSITE D'ALGER
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1968 — N°

LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE SON INTÉRÊT DANS LA RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX

THESE

pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le 13 Juillet 1968

par

Mme Fadila BOULAHBAL

Née le 16 Septembre 1941 à Khenchela

Interne des Hôpitaux d'Alger

Membres du Jury :

MM.	**T. HADDAM**, Maître de Conférence Agrégé (Chirurgie Thoracique)	Président
	P. COLONNA, Maître de Conférence Agrégé (Hématologie)	Juges
	J. GROSSET, Maître de Conférence Agrégé (Bactériologie)	
	D. LARBAOUI, Maître de Conférence Agrégé (Pneumo-Phtisiologie)	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536513_0021

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, et selon la tradition d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobe et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je dédie cette thèse

A notre Président

Monsieur le Professeur Agrégé T. HADDAM

Vous nous avez accueillie
avec bienveillance,
et vous nous avez fait
le grand honneur d'accepter
de présider cette thèse.

Nous vous en remercions
respectueusement.

A mes juges

Monsieur le Professeur Agrégé J. GROSSET

Nous avons été profondément touchée de la confiance que vous nous avez témoignée en nous accueillant dans votre laboratoire. Vous avez inspiré cette thèse et contribué à son élaboration. Soyez persuadé de notre profond dévouement.

Monsieur le Professeur Agrégé D. LARBAOUI

Nous vous sommes reconnaissante de l'honneur que vous nous faites en jugeant ce travail et de l'intérêt que vous n'avez cessé de témoigner à notre égard.

Monsieur le Professeur Agrégé P. COLONNA

Vous avez été notre conférencier d'Internat. Vous nous avez dispensé un enseignement et des conseils très précieux. Vous nous faites aujourd'hui un très grand honneur en acceptant de juger cette thèse.

A mes Conférenciers d'Internat et d'Externat

Monsieur le Professeur Agrégé P. CHAULET

Vous nous avez guidée dans nos études. Vous nous avez témoignée beaucoup de confiance et d'amabilité. Nous vous en remercions profondément et nous espérons continuer avec constance dans la voie que vous nous avez tracée.

Monsieur le Professeur Agrégé M. MARTINI

Nous arrivons au terme de nos études. Soyez persuadé que nous n'oublierons jamais le temps que vous nous avez consacré pour nous permettre de l'atteindre.

A Monsieur le Docteur R. NEEL

Nous vous sommes reconnaissante de la confiance que vous avez témoignée à notre égard en nous ouvrant les portes de l'Institut Pasteur.

A mes Maîtres des Hôpitaux et de la Faculté

A mes Beaux-Parents

A mes Parents

A mes Frères et Soeur

A mon Mari

A Mouna

A tous mes amis

A tous ceux qui m'ont aidée dans
la réalisation de ce travail.

INTRODUCTION

La recherche du bacille tuberculeux dans les crachats est le moyen le plus sûr de faire le diagnostic de tuberculose évolutive. Celui-ci peut être établi, soit par la culture, soit par l'examen microscopique. Dans ce dernier cas, le plus fréquemment mis en oeuvre, car il est de loin le plus aisé à pratiquer on utilise pour mettre en évidence le bacille tuberculeux la propriété fondamentale des mycobactéries : l'acido-alcoolo-résistance.

La coloration de Ziehl-Neelsen qui en découle consiste à colorer l'étalement susceptible de contenir des bacilles tuberculeux, par exemple un frottis de crachats, par la fuchsine phéniquée puis à faire agir de l'acide dilué et de l'alcool. Dans ces conditions seules les mycobactéries, dont le bacille tuberculeux, gardent la coloration par la fuchsine et apparaissent à l'examen microscopique comme des bâtonnets rouges.

Le but de notre travail est de voir dans quelle mesure on peut remplacer la fuchsine phéniquée de Ziehl par un autre colorant, l'auramine, qui confère au bacille tuberculeux une fluorescence jaune lorsqu'on éclaire la préparation par une lumière bleue ou ultraviolette. Avec cette méthode les bacilles apparaissent comme des traits brillants sur un fond noir.

Dans ces conditions, il n'est pas nécessaire d'examiner les préparations avec un objectif microscopique de fort grossissement nécessitant l'emploi

d'huile à immersion (objectif à immersion). Il suffit d'un objectif à sec, de faible grossissement, qui permet une mise au point facile et un examen beaucoup plus rapide des préparations.

Mais la recherche du bacille tuberculeux, grâce à l'emploi d'un colorant fluorescent, présente un inconvénient majeur : certaines substances ont une fluorescence propre et peuvent être confondues avec des bacilles tuberculeux et, par conséquent, entraîner de fâcheuses erreurs par excès.

Dans notre travail, après avoir rappelé le principe de la microscopie en fluorescence et l'évolution des connaissances en cette matière, nous examinerons les résultats d'une enquête comparative que nous avons effectuée sur la recherche du bacille tuberculeux par 3 méthodes :

- la microscopie en fluorescence,
- la microscopie classique après coloration de Ziehl-Neelsen, et
- la culture sur milieu de Lowenstein-Jensen.

Nous essayerons de préciser la sensibilité et la fidélité de la microscopie en fluorescence et nous verrons enfin dans quelle mesure cette méthode peut devenir un instrument de la lutte antituberculeuse.

PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE

Nous examinerons successivement :

- le principe de la fluorescence
- le principe du microscope à fluorescence
- les conditions d'utilisation du microscope à fluorescence.

I - PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE

Certaines substances ont la propriété d'absorber les radiations de courtes longueurs d'ondes et restituer l'énergie absorbée sous forme de radiations de longueurs d'ondes habituellement plus grandes (loi de STOKES).

Les radiations initiales sont appelées rayonnement d'excitation et les radiations réémises, rayonnement de fluorescence.

Les substances qui ont cette propriété sont dites fluorescentes. En pratique, il existe deux types de fluorescence. D'une part, la fluorescence directe ou primaire qui est liée à la constitution chimique propre de la substance. Ce sont surtout les préparations botaniques et minérales qui possèdent ce type de fluorescence.

Le deuxième type de fluorescence, utilisée en microbiologie, est la fluorescence secondaire ou indirecte. Dans ce cas, la fluorescence est conférée artificiellement à une préparation en l'imprégnant d'une

substance, le fluorochrome, qui a une fluorescence primaire.

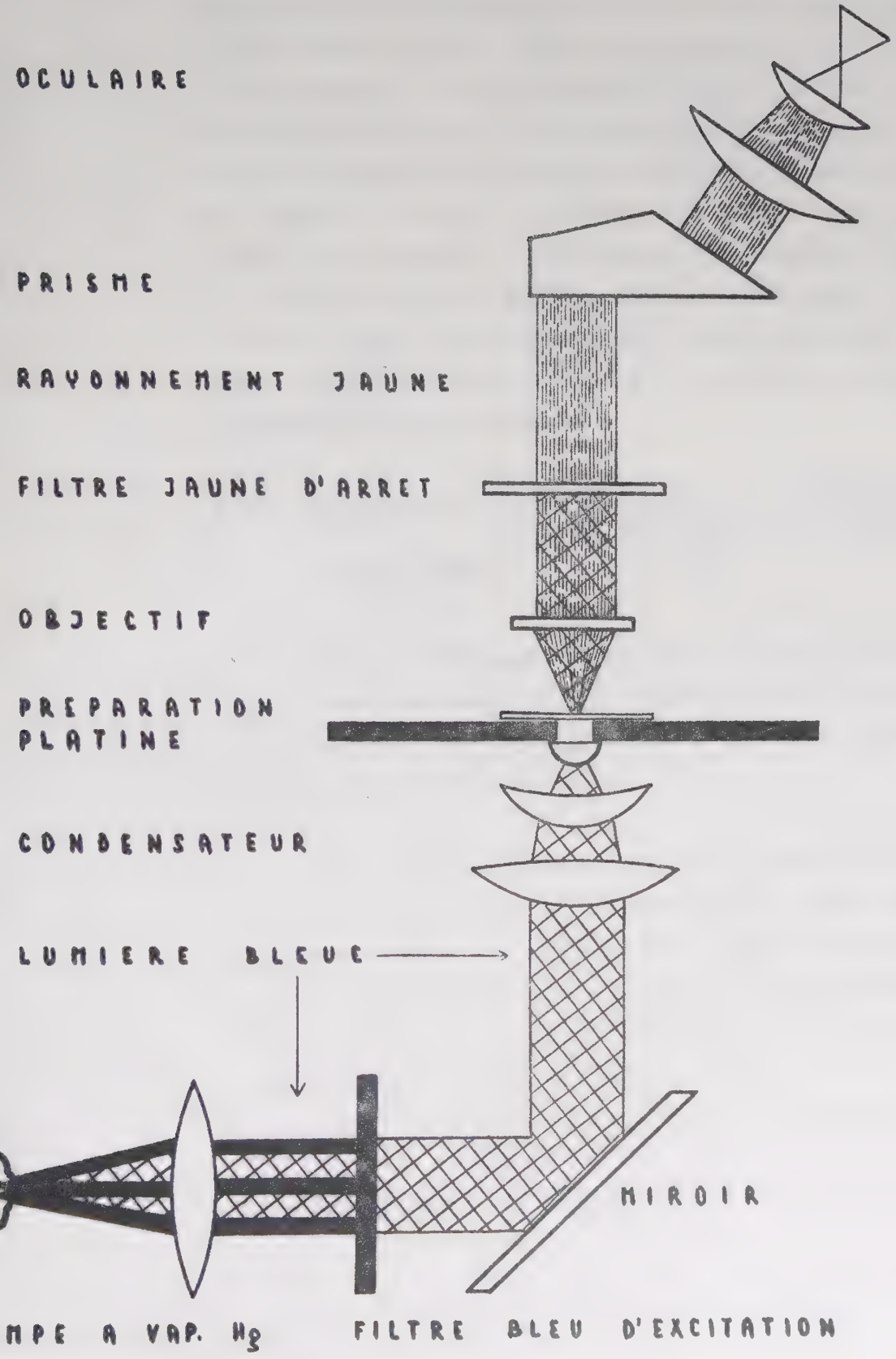
Le fluorochrome lui-même peut être utilisé de deux manières :

- soit couplé à un anticorps. On fait agir cet anticorps fluorescent sur l'antigène, ce dernier devenant alors fluorescent. C'est l'immuno-fluorescence, couramment employée pour le diagnostic sérologique de la syphilis et la recherche des Escherichia coli des gastro-enterites infantiles. Le fluorochrome est alors l'isothiocyanate de fluoresceine.
- soit seul. Dans ce cas, le fluorochrome imprègne directement la préparation : c'est la microscopie en fluorescence. Le fluorochrome est l'auramine et la méthode est utilisée essentiellement pour la recherche du bacille tuberculeux. On emploie la propriété qu'a le bacille de résister à la décoloration par l'acide et l'alcool pour le mettre en évidence. Il sera le seul à garder l'auramine et à apparaître fluorescent.

II - PRINCIPE DU MICROSCOPE A FLUORESCENCE

La fluorescence de l'auramine est excitée surtout par le rayonnement bleu. Il faut fournir, par conséquent, un rayonnement de courte longueur d'onde, et le plus intense possible, pour que l'énergie absorbée par l'auramine soit la plus forte possible.

L'auramine excitée va réémettre un rayonnement de fluorescence de couleur jaune, dont l'intensité est directement proportionnelle à celle de la lumière excitatrice.


OCULAIRE
PRISME
RAYONNEMENT JAUNE
FILTRE JAUNE D'ARRET
OBJECTIF
PREPARATION
PLATINE
CONDENSATEUR
LUMIERE BLEUE
MIROIR
MPE A VAP. Hg
FILTRE BLEU D'EXCITATION

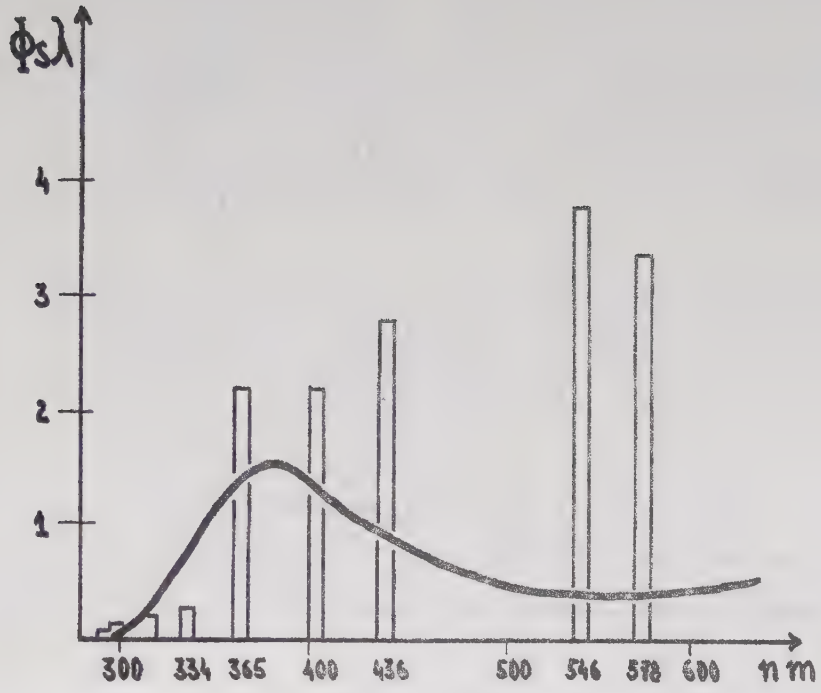
Mais le rayonnement de fluorescence réémis par l'auramine ne sera perceptible à l'oeil que dans la mesure où on aura arrêté, entre la préparation et l'oeil de l'observateur, le rayonnement bleu, qui est beaucoup plus important que le rayonnement fluorescent, issu, lui, uniquement de quelques bacilles fluorescents. On comprend ainsi, la nécessité d'un filtre d'arrêt jaune qui stoppera complètement la lumière bleue, et ne laissera passer que le rayonnement jaune. Le schéma de la page 5 représente le cheminement des différents rayonnements à travers les filtres dans un microscope à fluorescence.

III - CONDITIONS D'UTILISATION DE LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE

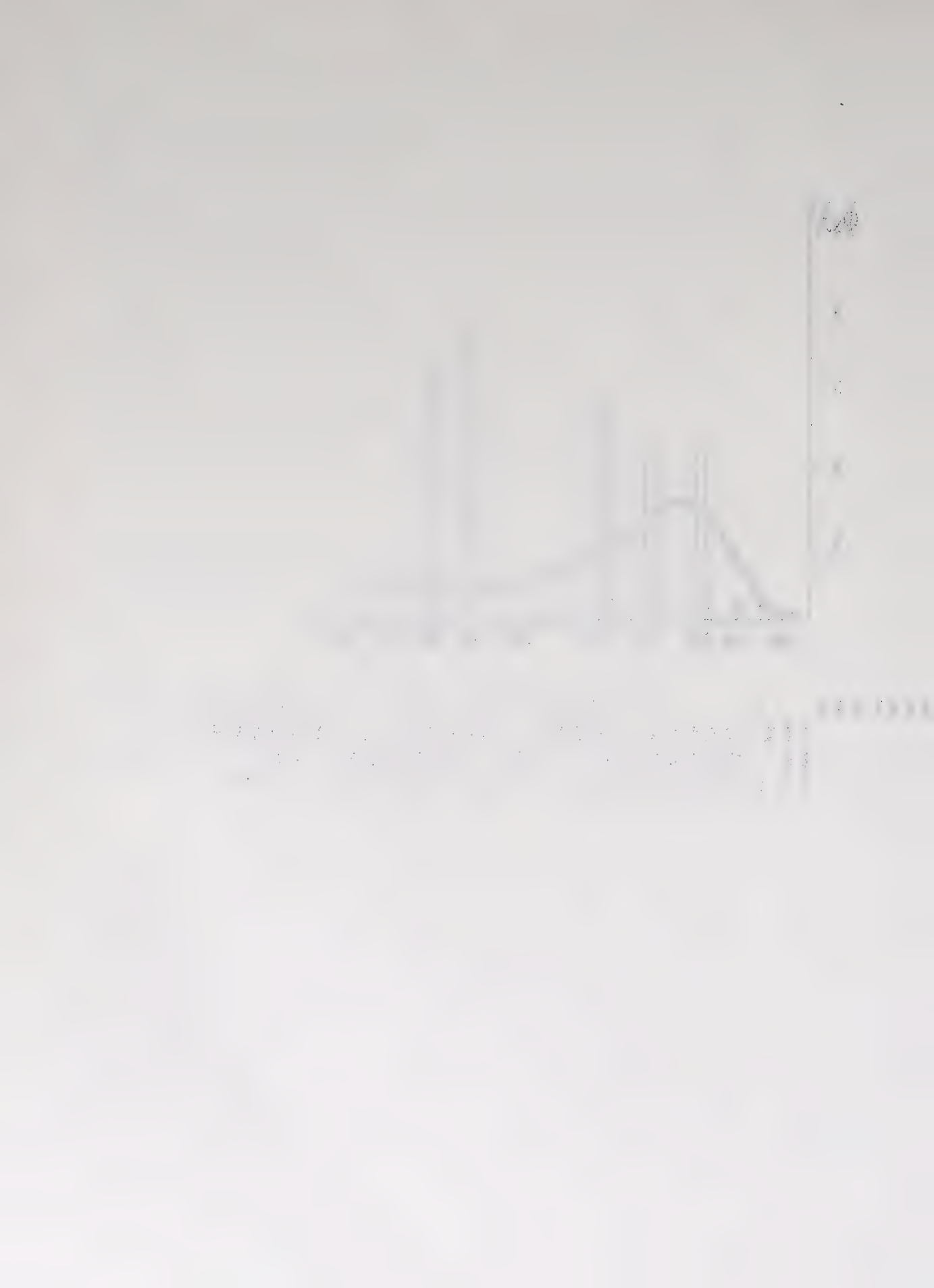
Il est évident aussi que la bonne visibilité des microorganismes et, en particulier, du bacille tuberculeux exige que certaines conditions physiques soient observées. (45,46)

La lumière excitatrice doit être, d'une part de forte intensité, et, d'autre part, très riche en rayonnement bleu. L'emploi d'une lampe à vapeur de mercure de forte intensité répond parfaitement à ces deux exigences. En effet, son intensité lumineuse est en moyenne de 25.000 stilbs (1). Les raies du spectre de la lumière émise s'étendent des longueurs d'onde

(1) Stilb = unité de luminance



SCHEMAS 2. REPARTITION DE L'ENERGIE SPECTRALE D'UNE LAMPE A VAPEUR DE MERCURE ET COURBE DE TRANSMISSION D'UN FILTRE BLEU

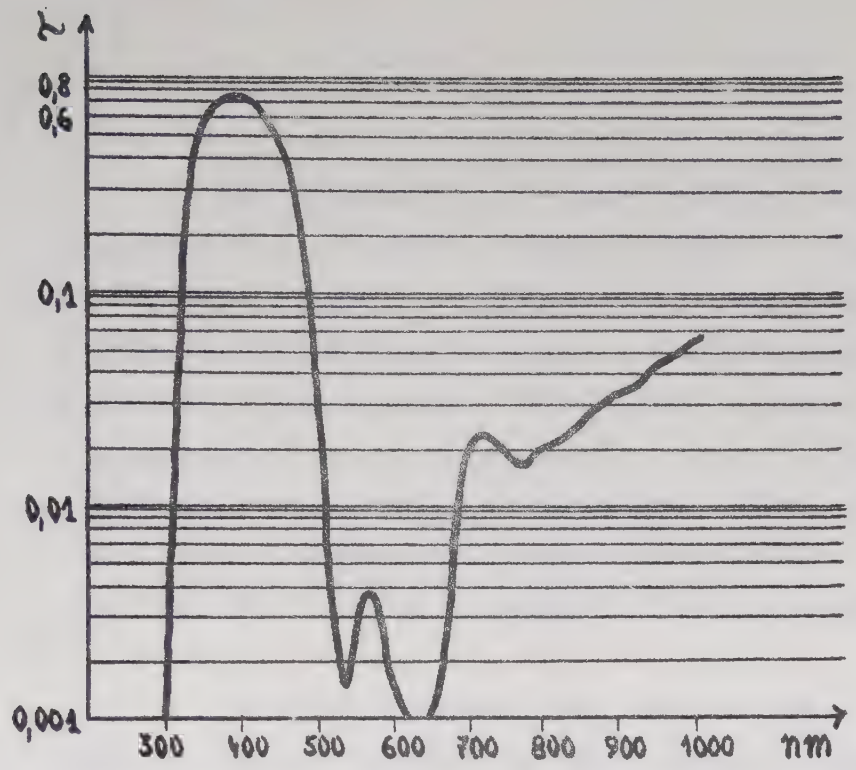


313 nm (nanomètre (2)) à 578 nm, comprenant, par conséquent, le rayonnement violet et beaucoup de rayonnement bleu qui a 450 nm de longueur d'onde. Mais ce qui importe aussi c'est l'énergie de chaque raie du spectre. A cet égard, le schéma nº 2 montre que les raies de courte longueur d'onde (365 nm à 456 nm) ont le maximum d'énergie dans le rayonnement bleu et le violet.

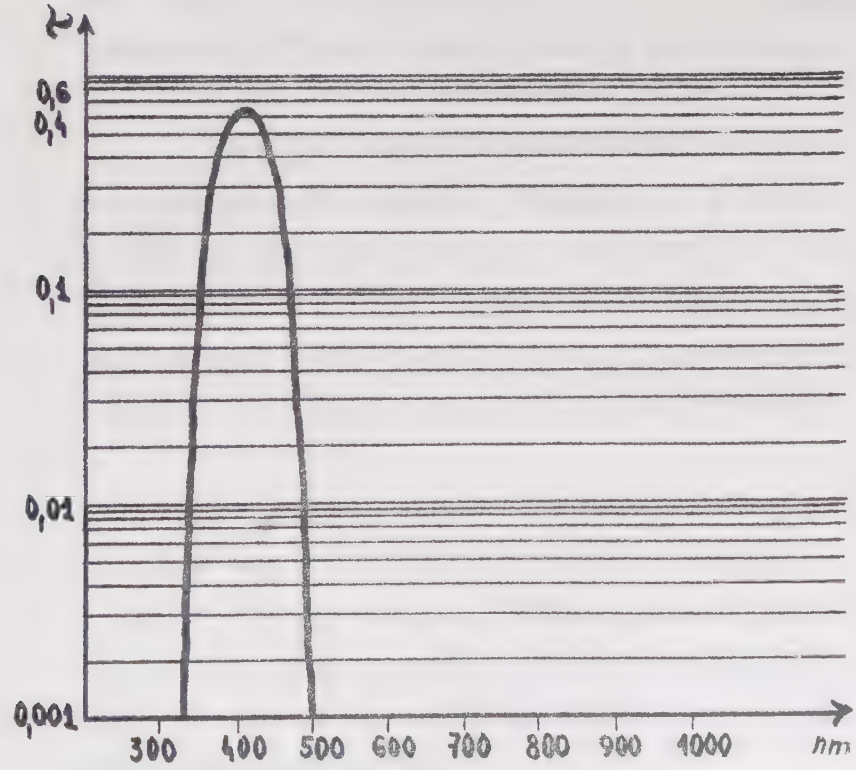
Ce sont ces raies de courte longueur d'onde et de forte intensité qui vont exciter la fluorescence de l'auramine. Pour les obtenir il suffit de placer entre la lampe et la préparation un filtre bleu qui ne laisse passer que la lumière de courte longueur d'onde. Le filtre BG I2, qui est un filtre bleu et que nous utilisons, convient parfaitement.

A titre d'exemple, le spectre d'absorption d'un filtre bleu commun est représenté sur le schéma nº 2. En plus, l'épaisseur du filtre BG I2 joue un rôle important. Plus le filtre est épais, plus son pouvoir de filtration est grand et plus il ne laisse passer que les rayons de longueur d'onde bien déterminée, ce qui est favorable. Mais, plus le filtre est épais, moins l'intensité lumineuse est forte, ce qui est défavorable.

(2) Nanomètre = 1 millimicron = 10 Angström



SCHEMAS 3 COURBE DE TRANSMISSION D'UN FILTRE BLEU BG-12 DE 1,5 mm



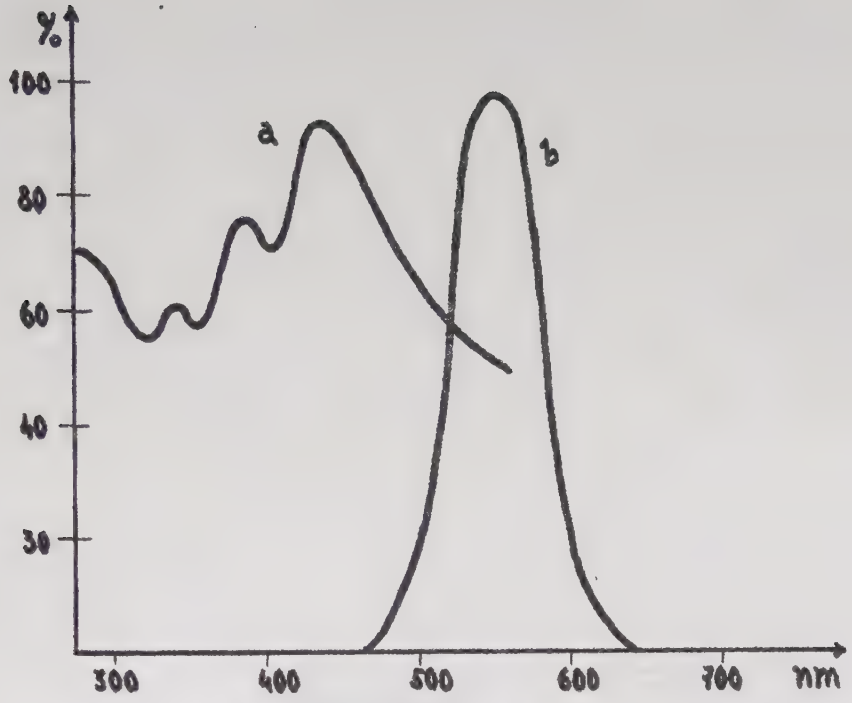
SCHEMAS 4 COURBE DE TRANSMISSION D'UN FILTRE BLEU BG-12 DE 5 mm

Les schémas 3 et 4 montrent les courbes de l'intensité de la lumière transmise par le filtre BG I2 de 1,5 mm et de 5 mm d'épaisseur. On constate que le premier filtre laisse passer, non seulement les longueures d'ondes entre 300 et 500 nm, mais aussi des longueurs d'ondes plus grandes et qu'il laisse passer 80 % du rayonnement. Le deuxième filtre n'est perméable qu'aux longueurs d'ondes entre 340 et 500 nm, mais le taux de lumière transmise n'est plus que de 60 %.

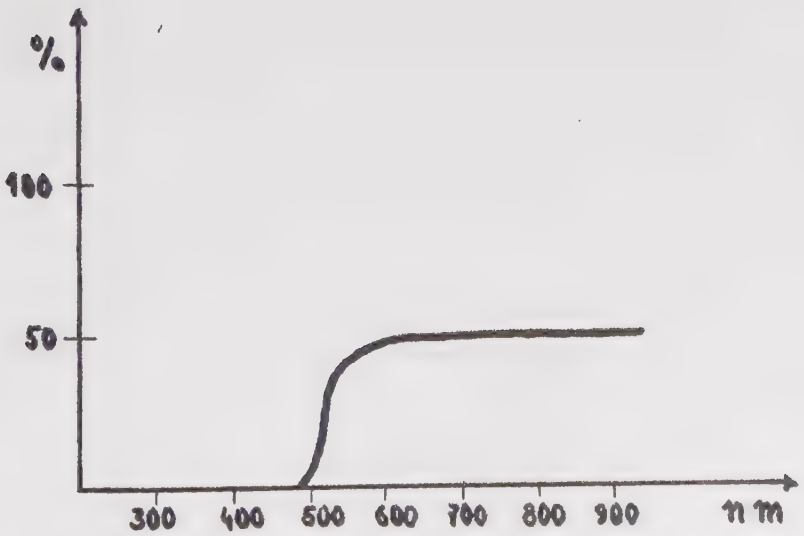
Le filtre jaune, lui, est destiné à ne laisser passer que la lumière de fluorescence jaune réémise par l'auramine. Dans ce but, on s'adresse à un filtre qui a un maximum d'absorption pour les longueurs d'ondes supérieures à 500 nm et qui est imperméable aux longueurs d'ondes inférieures à 500 nm.

Sur la courbe représentée sur le schéma 5, on se rend compte que les longueurs d'ondes inférieures à 500 nm sont celles qui excitent la fluorescence de l'auramine et les longueurs d'ondes supérieures sont celles qui correspondent aux longueurs d'ondes de la lumière de fluorescence (Loi de STOKES).

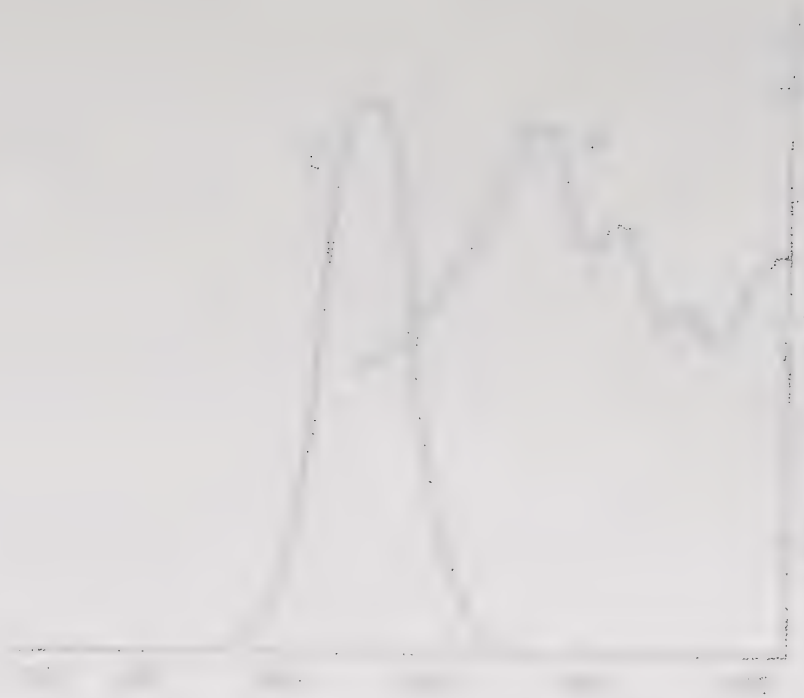
Le filtre jaune utilisé, dont la courbe de transmission est représentée sur le schéma 6, répond bien à cette nécessité. Le filtre jaune peut être, soit un filtre en verre teinté, tel le filtre d'arrêt "Bleu abs. de Leitz ", soit un filtre en gélatine genre Kodak Wratten nº I2.



EMAS 5 COURBE D'ABSORBTION (a) ET DE FLUORESCENCE (b) DE L'AURAMINE



EMAS 6 COURBE DE TRANSMISSION D'UN FILTRE D'ARRET



HISTORIQUE

Les premiers microscopes à fluorescence ont été mis au point par HEIMSTADT en 1911 (30) et par LEHMANN en 1913 (44).

Depuis, de nombreuses recherches ont été effectuées grâce à cette technique et de multiples travaux, en particulier allemands, ont montré qu'elle permettait de retrouver avec facilité les micro-organismes dans les différents produits pathologiques.

C'est en 1937 que HAGEMANN (28) appliquait pour la première fois cette méthode dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. D'autres auteurs ont employé par la suite cette technique pour la mise en évidence des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) dans différents types de prélèvements.

Autant d'essais, autant de critiques, autant d'améliorations apportées à la méthode, tant sur le plan de la microscopie que sur le plan de la coloration.

On a utilisé à tour de rôle : le microscope monoculaire, le microscope binoculaire et le microscope à fond noir (52,53). La source de lumière a été successivement : l'arc électrique, la lampe à filament de tungstène, la lampe à quartz et iode, la lampe à vapeur de mercure (Hg).

Les plus utilisées actuellement sont la lampe à filament de tungstène, économique mais de courte durée

et la lampe à vapeur de mercure. Cette dernière est coûteuse et nécessite un chauffage préalable car son rayonnement, progressivement croissant, n'atteint son niveau optimum d'utilisation qu'au bout de 15 minutes. Toutefois, elle a une durée d'utilisation très prolongée et fournit une lumière de forte intensité, riche en rayonnement bleu. Aussi, est-ce une lampe de ce type que nous utilisons.

La coloration de HAGEMANN consiste à fixer les frottis à la flamme, à les colorer à froid pendant 15 minutes par l'auramine à 1 % contenant 5 % de phénol. Les frottis sont ensuite lavés à l'eau. La décoloration est effectuée en trois minutes par l'alcool méthylique contenant 4 º/oo de HCL et 4 o/oo de Na Cl, la lame étant recouverte de mélange décolorant neuf, après une minute et demie de contact. On lave ensuite à l'eau, on sèche, et on examine avec un objectif à sec.

Depuis HAGEMANN, l'auramine a été utilisée par tous les auteurs comme fluorochrome dans la recherche des BAAR, par la microscopie en fluorescence. Peu de modifications ont été proposées en ce qui concerne le décolorant, seuls quelques auteurs ont remplacé l'H Cl par l'H2 SO_4 (7).

Par contre, d'importantes modifications ont été apportées dans les colorants. En effet, lorsque la méthode de Hagemann a été expérimentée sur de grands nombres de prélèvements pathologiques, on a constaté que

l'interprétation des frottis était considérablement gênée par l'existence d'artéfacts spontanément fluorescents. Dans le but d'éliminer ces fluorescences parasites, certains auteurs ont essayé de conférer une coloration particulière au fond de la préparation, destinée fondamentalement à éteindre les fluorescences parasites.

C'est ainsi que l'on a fait suivre le temps de décoloration par l'acide et l'alcool, par un temps supplémentaire de recoloration par une substance non adsorbable par les BAAR. Les recolorants utilisés ont été successivement : le mélange Bleu de Méthylène - Permanganate dilué (HERRMANN, 1938 (32), la Fuchsine acide (3,11,49), le cristal violet-bleu de Méthylène (HAUDUROY, 1941).

La recoloration diminue, certes, les fluorescences parasites, mais diminue aussi la fluorescence des bacilles, ce qui les rend plus difficilement repérables à l'examen microscopique. La mise au point est également plus difficile à réaliser, surtout lorsque les frottis sont pauci-bacillaires.

Pour obvier à ce nouvel inconvénient, on a proposé non pas d'éteindre le fond de la préparation, comme dans les techniques précédentes, mais d'employer deux fluorochromes différents dont l'un se fixera sur le bacille et l'autre sur les substances fluorescentes parasites.

Les fluorochromes à combiner doivent répondre à deux critères : avoir une affinité différente, d'une part, et une couleur de fluorescence différente, d'autre part. Les BAAR étant basophiles, l'auramine a toujours été le fluorochrome employé pour les bacilles, tandis que divers fluorochromes acides ont été employés pour le fond : Rhodamine B (13,36) Jaune d'acridine (HUGUES (38) Rouge Thiazine (18,19,20;57).

Dans toutes les techniques, on fait agir le fluorochrome basique en premier qui va se fixer sur tous les éléments de la préparation. La décoloration par l'acide et l'alcool ne va laisser que les bacilles colorés par l'auramine. On colore ensuite, rapidement, par un fluorochrome acide qui ne se fixera que sur les autres éléments du frottis. Lorsqu'on utilise l'auramine et le rouge thiazine (DEGOMMIER 1957) les bacilles se détachent en jaune brillant sur le fond rouge sombre du reste de la préparation. Bien que les avantages théoriques de cette double coloration paraissent décisifs, ils le sont moins en pratique car les fluorescences ne se différencient pas toujours aisèment.

Nous insistons, au terme de cet historique, sur le fait que la recherche du bacille tuberculeux en microscopie en fluorescence a suscité de nombreux travaux. Ces travaux ont été tous orientés vers la simplification de l'appareillage et de la méthode de coloration pour rendre plus facile et plus juste l'interprétation des préparations.

Actuellement, il y a deux techniques en concurrence :

- d'une part, celle de MITCHISON et Coll.(34) qui est une simple coloration fluorescente avec le Mn 04 K, extincteur du fond,
- d'autre part, celle de DEGOMMIER (18) qui est basée sur une double coloration fluorescence par Auramine + Thiazine.

Pour notre part, nous avons choisi par commodité, et surtout par goût, la méthode de MITCHISON, dont nous allons étudier l'efficacité. Toutefois, avant d'aborder ce sujet, nous voudrions rappeler que, reconnue par la majorité des auteurs comme une méthode plus rapide que la microscopie en lumière blanche, la microscopie en fluorescence a un inconvénient majeur : celui d'exposer à des erreurs par excès, c'est-à-dire à des risques de résultats faussement positifs.

Certains auteurs (5 et 14) ont, devant ces risques, vivement déconseillé l'emploi de la microscopie en fluorescence malgré ses autres avantages.

D'autres, au contraire (6,7,34,50) ont tenté, avec plus ou moins de bonheur il est vrai, de trouver une explication aux discordances constatées, et ont conseillé de faire de la microscopie en fluorescence une méthode de routine dans la recherche du bacille tuberculeux.

C'est l'analyse des avantages et des risques de la microscopie en fluorescence qu'à notre tour nous avons tenté de faire.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I - LE MICROSCOPE

L'appareil que nous utilisons pour la lecture des lames colorées à l'auramine est un microscope binoculaire LEITZ, type LABORLUX, spécialement équipé pour la microscopie en fluorescence.

Le système d'éclairage comprend : une lampe à vapeur de mercure, type OSRAM, HBO 200, fonctionnant sur courant alternatif de 220 volts par l'intermédiaire d'un transformateur. La lampe est contenue dans un boitier fixé sur le corps du microscope, ce qui empêche tout déréglage intempestif de la lampe. Le boitier contient, en outre, un filtre anticalorique de type KG1 de 2 mm d'épaisseur et un ensemble de filtres bleus de type BG I2 de différentes épaisseurs (1,5 mm - 3 mm et 5 mm) que l'on peut, selon les besoins, placer ou déplacer sur les trajets des rayons lumineux.

Le système optique comporte : un condensateur à fond clair, 2 objectifs dits métallographiques permettant de travailler sans lamelles couvre-objet, l'un de faible grossissement (X 25) l'autre de plus fort grossissement (X 40). Ces deux objectifs achromatiques ont une très faible fluorescence propre. L'objectif de faible grossissement permet l'exploration de la préparation, tandis que l'objectif de fort grossissement sert à l'analyse des détails. Le passage de l'un à l'autre des objectifs se fait par simple rotation du révolver porte-objet dans un sens ou dans l'autre.

Les oculaires utilisés sont de type PERIPLAN, de grossissement X6. Entre les objectifs et les oculaires, un filtre d'arrêt jaune est placé. Il s'agit, soit d'un filtre en gélatine Kodak Wratten nº I2, soit d'un filtre en verre Leitz " Bleu-Abs ".

La lecture des lames colorées par le Zichl-Neelsen se fait au microscope ordinaire avec un objectif à immersion X 100 et un oculaire de grossissement faible x 6.

Le grossissement de l'objet avec le microscope en fluorescence est 4 fois plus faible qu'avec le microscope ordinaire en lumière blanche (X 25 au lieu de X I00). La surface du champ observé, qui est inversement proportionnelle au carré de grossissement, est 16 fois plus grande avec le microscope en fluorescence qu'avec le microscope ordinaire en lumière blanche. On examine ainsi une lame 16 fois plus vite avec le premier qu'avec le second. L'examen de 5 minutes avec le premier correspond donc à un examen de 90 minutes avec le second. Tout l'avantage de la microscopie en fluorescence est là.

II - LES PRELEVEMENTS

Entre le 9 novembre 1967 et le 23 février I968, nous avons examiné I252 prélèvements pathologiques. Ces prélèvements nous ont été adressés par différents centresde soins d'Alger et du reste du territoire.

Les centres de soins d'Alger ont fourni 1164 prélèvements : 721 nous ont été adressés par les hôpitaux, 200 par les sanatoriums, 68 par les dispensaires antituberculeux et 195 prélèvements viennent de diverses autres provenances. Nous n'avons reçu que 68 prélèvements des centres de soins situés hors d'Alger.

Ainsi 367 prélèvements sont arrivés au laboratoire le jour même de leur collecte sur les malades ; 283 sont arrivés le lendemain ou après 24 heures de retard environ ; 59 sont arrivés entre le 3ème et le 6ème jour et 22 sont arrivés après le 7ème jour. Sur 521 la durée de l'acheminement est restée indéterminée.

Ces prélèvements ont consisté en 631 crachats, 328 tubages gastriques, 50 aspirations bronchiques, 96 liquides céphalo-rachidiens, 60 liquides pleuraux, 31 urines et 28 ont été classés dans la catégorie des divers.

Aucun choix n'a présidé au rassemblement de ces prélèvements. 667 spécimens viennent de malades en cours de traitement depuis plus de 15 jours et 483 spécimens viennent de malades non traités ou en cours de traitement depuis moins de 15 jours. Pour I02 prélèvements, le traitement n'a pas été précisé.

III - METHODES

Sur chacun des prélèvements nous avons effectué systématiquement un frottis pour coloration de Ziehl Neelsen, un frottis pour coloration par l'auramine et une culture sur milieu de Lowenstein. Lorsque la culture a été positive, la sensibilité des bacilles aux antibiotiques a été chaque fois mesurée.

Les différentes techniques de coloration, de culture et d'antibiogramme employées ont été les suivantes :

a) frottis de crachat : le frottis s'effectue sur des lames de verre neuves. Le numéro d'ordre du crachat est gravé avec une pointe de diamant.

On prélève avec une anse de platine rigide, préalablement flambée et refroidie, une parcelle purulente ou hémorragique du crachat. Le contenu de l'anse est étalé en couche mince par des mouvements de va et vient longitudinaux et transversaux. L'étalement est effectué en rectangle sur la totalité des deux tiers de la lame opposés à la marque. L'étalement terminé, le frottis est laissé sécher à l'air.

b) la coloration de Ziehl-Neelsen : l'étalement sec, fixé par trois passages rapides dans la flamme, frottis au-dessus, est prête à la coloration. Celle-ci a lieu

en trois temps :

1er temps : coloration

La lame est placée sur un support en métal. On la recouvre en totalité de fuchsine de Ziehl. On chauffe doucement jusqu'à émission de vapeur. On laisse agir 15 minutes en chauffant la lame trois fois.

2ème temps : décoloration

Le colorant est rejeté et on lave immédiatement à l'eau ordinaire. On recouvre d'acide sulfurique au I/4 pendant 3 minutes. On lave et on recouvre d'alcool à 95º pendant 5 minutes. On lave à nouveau à l'eau ordinaire.

3ème temps : contre-coloration

On recolore pendant 30 secondes par une solution de bleu de Méthylène, on lave à grande eau et on laisse sécher. La préparation est prête à l'examen microscopique.

c) la coloration à l'auramine : la technique d'étalement et de fixation du frottis est la même que pour la méthode de Ziehl-Neelsen. La coloration employée est celle de HOLST, MITCHISON et RADHAKRISHNA 1959, (34) Elle confère aux bacilles une coloration jaune.

Réactif : Auramine phéniquée

- acide phénique aqueux	33 g
- eau distillée	1ooo ml
Chauffer à 45 º - Ajouter	
- Auramine	3 g

Acide-alcool

- Chlorure de sodium 20 g
- Acide chlorhydrique 20 ml
- Eau distillée 500 ml
- Alcool à 75 º I500 ml

Permenganate de potassium à 0,1 % dans l'eau distillée.

Technique : Les frottis sont colorés sans chauffage pendant 10 minutes par la solution d'auramine phéniquée lavés, décolorés par l'acide-alcool pendant 4 minutes et finalement recolorés par le permenganate de potassium pendant 30 secondes, lavés et séchés.

d) L'examen microscopique : Deux techniciens différents examinent les lames. L'un les lames colorées par la méthode de Z.N., l'autre celles qui sont colorées par l'auramine.

1) Examen microscopique des lames colorées par le Z.N.

La lame colorée est examinée avec un objectif à immersion x 100 et un oculaire de grossissement moyen x 6. On note exactement le nombre de BAAR visibles, qui doivent apparaître comme de fins bâtonnets rouges, légèrement incurvés, quelquefois granuleux, isolés par paires ou en amas, se détachant nettement sur le fond bleuté de la préparation.

Lorsque le frottis montre plus d'un bacille par champ microscopique, on examine une vingtaine de champs

pour s'assurer que la richesse en bacilles est approximativement la même pour tous les champs.

On établit une moyenne du nombre de bacilles par champ. Lorsque la préparation contient des bacilles, mains moins de 1 par champ, on examine cent champs microscopiques et on établit la moyenne du nombre de bacilles par loo champs.

Lorsque la préparation ne montre pas de bacilles sur 100 champs, l'examen est arrêté et sa conclusion est : 0 BAAR/I00 champs, ce qui sera synonyme dans notre travail de bacilloscopie négative (ZN = 0). La durée d'examen de I00 champs microscopiques est de 5 minutes en moyenne.

2) Examen des lames colorées par l'auramine

L'examen microscopique s'effectue sans objectif à immersion. Les lames sont examinées avec l'objectif x 25 et l'oculaire x 6. Le grossissement total obtenu est multiplié par 150.

Chaque fois qu'une image suspecte d'être un bacille est décelée on contrôle en passant à l'objectif x 40. Seuls les bacilles indiscutables de par leur morphologie et leur taille sont décomptés. Les formations douteuses sont systématiquement éliminées du compte.

Lorsque le frottis montre plus de 100 bacilles par champ, on examine une dizaine de champs pour con-

trôler que la richesse est identique dans tous les champs.

Lorsque le frottis montre plus de un bacille par champ, mais moins de 100, on examine une vingtaine de champ et on établit la moyenne du nombre de bacilles par champ. Lorsqu'il y a des bacilles sur la préparation, mais moins de un bacille par champ, on regarde une cinquantaine de champs et on établit la moyenne du nombre de bacilles par champ.

Lorsqu'on ne trouve pas de bacilles, on explore alors toute la lame. Dans ce cas, la réponse est : Absence de BAAR sur toute la lame.

L'examen complet de toute la lame dure environ 5 minutes.

e) Culture sur milieu de Lowenstein-Jensen

1) Le crachat : 3 à 4 ml de la partie la plus purulente du crachat sont placés dans un tube à centrifuger contenant une dizaine de billes de verre stériles et fermé hermétiquement. On y ajoute une quantité égale de Na OH à 6 % et 3 gouttes d'indicateur de Ph (bleu de Bromothymol). Le mélange est homogéneisé par 3 minutes d'agitation sur agitateur de Kahn, puis placé à l'étuve à 37 º pendant 50 minutes. A la sortie de l'étuve, il est immédiatement neutralisé par quelques gouttes de H2 S 04 à I5 %. Le produit final est ensemencé à raison de 10 à 20 gouttes par tube, sur 4 tubes de milieu de Lowenstein-Jensen. Les cultures placées à l'étuve à 37º sont examinées au 2Ième - 28ème et 42 ème jours et gardées jusqu'au 72ème jour si elles sont négatives.

Lorsqu'elles sont positives, les colonies, soigneusement décomptées, sont immédiatement prélevées et leur sensibilité mesurée aux antibiotiques usuels.

2) Prélèvements autres que les crachats : Les prélèvements contaminés (tubages gastriques, urines, etc...) sont traités comme les crachats après centrifugation, si nécessaire. Les prélèvements non contaminés (L.C.R. pus ganglionnaire etc...) sont ensemencés directement sur milieu de Lowenstein-Jensen, sans centrifugation préalable, à raison de 0,5 ml par tube. L'examen des cultures est identique à celui des cultures des crachats.

f) Tests de Résistance

La technique suivie est la variante simplifiée de la méthode des proportions (CANETTI, 1963 (16)
Les antibiotiques auxquels la sensibilité des bacilles est mesurée sont les suivants : Isoniazide (INH) Streptomycine (SM) Acide-paraaminosalicylique (PAS) Ethionamide (I3I4) Cyclosérine (CS) Viomycine (VM) Kanamycine (KM).

CHAPITRE II

RESULTATS

Nous exposerons d'abord les résultats globaux obtenus en comparant les trois méthodes : coloration par le Ziehl-Neelsen - coloration par l'auramine et culture sur milieu de Lowenstein-Jensen. Nous envisagerons ensuite la sensibilité et la fidélité de la microscopie en fluorescence dans la recherche des bacilles acido-alcoolo-résistants (B.A.A.R.)

I - RESULTATS GLOBAUX - Sur I252 prélèvements examinés, la culture sur milieu de Lowenstein-Jensen a été positive dans 3I9 cas ; l'examen au microscope en fluorescence, après coloration à l'auramine, a montré 242 cas positifs, tandis que l'examen en microscopie ordinaire, après coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen, ne s'est avéré positif que dans I30 cas.

Tableau 1 - Résultats comparatifs des 3 méthodes de recherche des BAAR

Total	Ziehl-Neelsen		Fluorescence		Culture +		Culture -		Culture contaminée	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
I252	I30	I0,4	242	I9,3	3I9	25,5	847	67,6	86	6,9

Nous constatons ainsi que la culture est plus fréquemment positive que l'examen en microscopie en fluorescence, 25,5 % des cas, contre 19,3 % des cas et que celle-ci est près de 2 fois plus souvent positive que la méthode de Ziehl-Neelsen : 19,3 % contre I0,4 %.

II - ETUDE DE LA SENSIBILITE DE LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE

La mesure de la sensibilité de la microscopie en fluorescence peut être effectuée en comparant les résultats donnés par le Ziehl-Neelsen et la fluorescence avec les échantillons positifs en culture.

Nous examinerons d'abord la fréquence de positivité du Ziehl-Neelsen et de la fluorescence et ensuite leur richesse en BAAR.

1) Fréquence de positivité du Ziehl et de la fluorescence lorsque la culture est positive -

Le tableau nº 2 montre la fréquence de positivité de la microscopie en fluorescence et du Ziehl-Neelsen des 3I9 prélèvements positifs à la culture.

Tableau 2 - Fréquence de positivité du Ziehl-Neelsen et de la fluorescence des prélèvements positifs en culture

Culture +	Ziehl-Neelsen +		Fluorescence +	
	N	%	N	%
3I9	115	36	I92	60,2

De ces 3I9 échantillons, 115 sont positifs après coloration de Ziehl-Neelsen et 192 positifs après coloration à l'auramine. Ainsi sur les échantillons

positifs en culture, des bacilles sont mis en évidence par la méthode de Ziehl-Neelsen dans 36 % des cas et par la microscopie en fluorescence dans 60,2 %.

La différence entre le Ziehl-Neelsen et la fluorescence est importante. Elle est de l'ordre de 20 % en faveur de la fluorescence.

La recherche du bacille tuberculeux par la microscopie en fluorescence est, par conséquent, plus sensible que la recherche par le Ziehl-Neelsen. 25 % des prélèvements contenant des bacilles tuberculeux et négatifs au Ziehl-Neelsen sont découverts par la microscopie en fluorescence.

Nous avons cherché à savoir dans quelle mesure la sensibilité relative du Ziehl-Neelsen et de la fluorescence variait en fonction de la richesse des prélèvements à la culture. Dans ce but, nous avons distingué, comme le montre le tableau nº 3, les cultures ayant donné moins de 100 colonies et les cultures ayant donné plus de 100 colonies.

Tableau 3 - Fréquence de positivité du Ziehl et de la fluorescence en fonction de la richesse de la culture

Nombre de colonies	Total	Ziehl-Neelsen +		Fluorescence +	
		N	%	N	%
1 à 99	I6I	2I	I3	60	37,3
I00 et +	I58	94	59,5	I32	83,5

Les 158 prélèvements qui ont donné un nombre de colonies supérieur à 100 sont positifs dans 59,5 % des cas au Ziehl-Neelsen et dans 83,5 % des cas en fluorescence.

Lorsque la culture a donné moins de 100 colonies le Ziehl-Neelsen a été positif dans 13 % des cas et la fluorescence dans 37,3 %.

La différence des résultats positifs entre les deux méthodes est de 24 % que les prélèvements aient ou non une positivité élevée en culture. La microscopie en fluorescence est donc toujours plus avantageuse que la méthode de Ziehl. Soulignons en particulier que dans les cas où la culture donne plus de 100 colonies la fluorescence est positive dans plus de 4 cas sur 5 contre 3 cas sur 5 pour le Ziehl-Neelsen.

2) Richesse du Ziehl et de la fluorescence lorsque la culture est positive

Si l'on examine la richesse de la fluorescence en fonction du Ziehl-Neelsen des prélèvements à culture positive, on constate qu'il existe un parallelisme très net entre les deux moyens d'investigation microscopique.

Au fur et à mesure que la richesse du Ziehl augmente, la richesse de la fluorescence augmente. Schématiquement on voit 50 à 100 fois plus de bacilles avec

la fluorescence qu'avec le Ziehl. Ainsi lorsqu'il y a 9 bacilles pour 100 champs microscopiques avec la coloration de Ziehl, on voit dans la moitié des cas 1 à 9 bacille par champ avec la fluorescence. Ce fait ne doit pas étonner puisque le champ couvert par l'objectif à sec " X 25 " est 60 fois plus grand que celui que couvre l'objectif à immersion. Toutefois le parallélisme n'est pas absolu : il y a des fluorescences pauvres pour des Ziehl riches (au moins deux cas) et surtout il y a 5 cas de fluorescence négative avec des Ziehl-Neelsen positifs. Comme ce n'est pas le même frottis qui a été examiné par le Ziehl et la fluorescence, mais deux frottis faits simultanément, il est tentant d'imaginer qu'il s'agit, dans tous les cas, de simples erreurs techniques et non pas de discordances réelles.

Tableau 4 - Richesse comparée du Ziehl et de la fluorescence des 319 prélèvements positifs à la culture

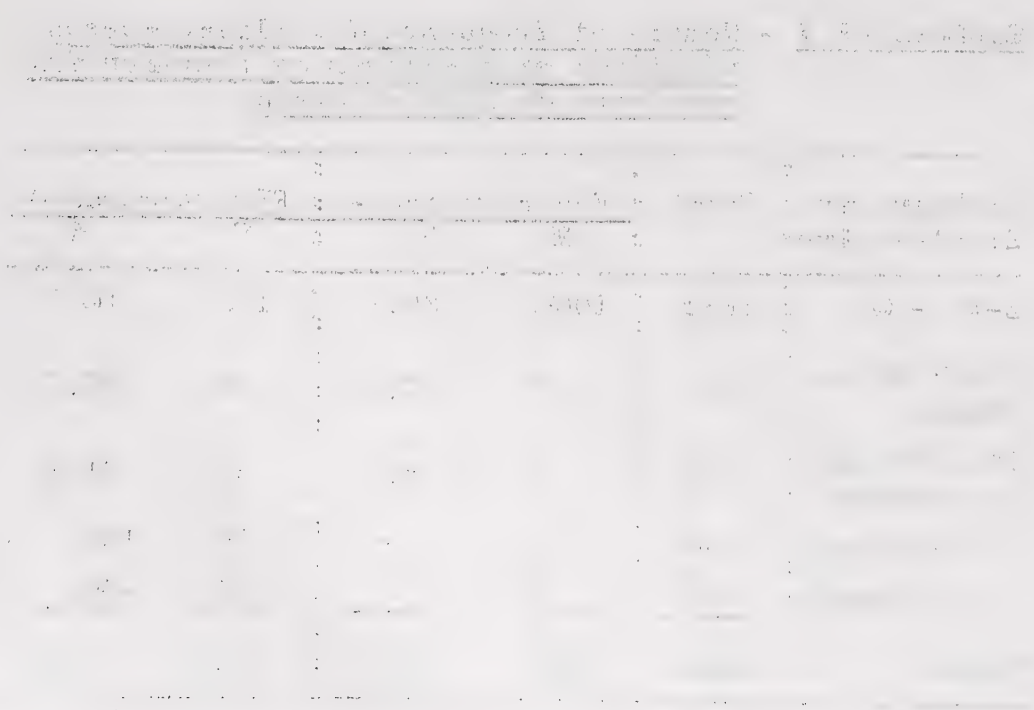
Ziehl	Total	FLUORESCENCE											
		0		1 à 9 par lame		de 10 par lame à < de 1 p/champ		1 à 9 par champ		10 à 99 par champ		Plus de 100 p/champ	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0	204	122	59,8	24	11,8	24	11,8	27	13,2	5	2,5	2	0,9
1 à 9 p/100 champs	24	4	16,7	2	8,3	4	16,7	12	50	2	8,3	0	
10 à 99 p/100 champs	48	1	2,1	1	2,1	2	4,2	25	52,1	13	27	6	12,5
1 à 9 p/champ	30	0		1	3,3	0		4	13,3	5	16,6	20	66,6
10 & + p/champ	13	0		0		1	7,7	3	23,1	3	23,1	6	46,2
Total	319	127	39,8	28	8,8	31	9,7	71	22,3	28	8,8	34	10,6

En réalité, ces discordances entre le Ziehl et la fluorescence, discordances qui ne sont pas toujours en faveur de la fluorescence, méthode beaucoup plus sensible que le Ziehl, se retrouvent également lorsqu'on étudie comparativement les résultats du Ziehl et de la fluorescence sur l'ensemble des prélèvements (cultures positives et cultures négatives).

A cet égard, le tableau nº 5 montre que sur les 1252 prélèvements examinés, il n'y a eu que 10 cas - moins de 1 % des prélèvements - où le Ziehl-Neelsen a été positif, et où la fluorescence a été négative. Ces cas sont évidemment peu nombreux par rapport aux 122 cas, soit 10 % des prélèvements où la fluorescence a été positive et le Ziehl-Neelsen négatif. Ils sont, par conséquent, très vraisemblablement dûs à des erreurs techniques.

Tableau nº 5 - Nombre et fréquence des fluorescences négatives et positives en fonction des résultats du Ziehl-Neelsen

Richesse du Ziehl-Neelsen	Total	Fluorescence -		Fluorescence +	
		N	%	N	%
Z-N - 0	II22	1000	89,1	I22	I0,8
1 à 9 B/1oo champs	29	5	17,2	24	82,7
10 à 99 par 1oo champs	56	5	8,9	51	91,1
1 à 9/champ	30	0	-	30	100
≥ 1o/champ	15	0	-	I5	I00
Total	I252	I0I0	80,6	242	I9,3



3) Influence de la sensibilité des bacilles aux antibiotiques sur la fréquence de positivité du Ziehl-Neelsen et de la fluorescence

On sait que les bacilles isoniazido-résistants sont d'une virulence atténuée. On peut donc se demander si les souches bacillaires résistantes à l'isoniazide -c'est-à-dire la quasi- totalité des souches résistantes rencontrées - ne seraient pas responsables chez le malade qui en est porteur d'expectorations moins richement bacillifères, donc de Ziehl et de fluorescence moins fréquemment positifs.

Le tableau nº 6 permet de répondre à ces différentes interrogations. Il montre, contrairement à ce que l'on aurait pu supposer, que les souches résistantes donnent un peu plus souvent que les souches sensibles, plus de 100 colonies de bacilles tuberculeux par tube de milieu de culture, 51,9 % contre 46,5 %. Par contre la fluorescence est un peu plus souvent positive avec les souches sensibles qu'avec les souches résistantes, 61,2 % contre 60, 4 %

Tableau nº 6 - Fréquence de positivité du Ziehl et de la fluorescence et richesse en colonies des prélèvements selon la sensibilité de la souche bacillaire

Sensibilité aux antibiotiques	Total testé	Ziehl-Neelsen +		Fluorescence +		Nombre de colonies en culture - 100		+ 100	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Sensible	I42	46	32,3	87	61,2	76	53,5	66	46,5
Résistant	I62	63	38,8	98	60,4	78	48,1	84	51,9
Total	304	I09	35,8	185	60,8	I54		150	

Ces résultats paradoxaux s'expliquent vraisemblablement par la chimiothérapie que reçoivent la majorité des malades dont les prélèvements ont été étudiés.

La chimiothérapie empêcherait la multiplication des bacilles sensibles qui restent pourtant visibles. On a donc avec les souches sensibles des fluorescences plus souvent positives et des cultures plus souvent paucibacillaires.

Avec les souches résistantes, rien de tel ne se produit puisque les bacilles résistants sont insensibles au traitement.

Ainsi la sensibilité des souches n'augmente pas la fréquence des positivités de la fluorescence, tout au contraire. On peut se demander dans quelle mesure elle n'est pas à l'origine de cas de " fluorescence positive - culture négative ".

III - Etude de la fidélité de la microscopie en fluorescence

La fidélité de la microscopie en fluorescence peut s'étudier de deux manières : d'abord, en étudiant les fluorescences négatives et en voyant dans quelle mesure elles correspondent à des cultures négatives et inversement en examinant les fluorescences positives et en voyant dans quelle mesure elles correspondent à des cultures positives.

1º - Fidélité des fluorescences négatives - Cas particulier des fluorescences douteuses.

Un des premiers problèmes qui se posent lorsqu'on examine les lames colorées par l'auramine est celui de la définition de la négativité. En effet, il est fréquent que la lame montre, lorsqu'on examine toute sa surface, quelques éléments de forme vaguement bacillaire (débris cellulaires, condensation de mucus etc...) qui peuvent en imposer pour des bacilles.

Nous définissons par fluorescence douteuse la présence sur la lame de très rares (1 à 3) formes bacillaires d'aspect non absolument caractéristique et qui ont conduit le lecteur à l'interprétation : Fluorescence? Cette éventualité a été rencontrée 74 fois au cours de notre travail. La question est de savoir quelle signification il faut attribuer à ces cas. Dans ce but, nous avons comparé les résultats de la culture des échantillons négatifs à la fluorescence, des échantillons négatifs au Ziehl-Neelsen et des échantillons douteux à la fluorescence comme on peut le constater sur le tableau nº 7.

Tableau nº 7 - Résultat de la culture des prélèvements négatifs et douteux à la fluorescence et des prélèvements négatifs au Ziehl Neelsen

Examen direct	Total	Culture (+)		Culture (-)		Culture contaminée	
		Nb	%	Nb	%	Nb	%
- FL (-)	936	I09	11,6	762	81,4	65	6,9
- FL (?)	74	I8	24,3	48	64,8	8	I0,8
- ZN (-)	II22	205	I8,2	836	74,4	81	7,2

936 prélèvements négatifs en fluorescence ont donné 11, 6 % de cultures positives et 81,4 % de cultures négatives ; 1122 prélèvements négatifs au Ziehl-Neelsen ont donné 18,2 % de cultures positives et 74,4 % de cultures négatives. La culture est donc plus souvent négative lorsque la fluorescence est négative que lorsque le Ziehl-Neelsen est négatif. Ces résultats sont en faveur de la fidélité de la microscopie en fluorescence.

Les fluorescences douteuses ont donné 24,3 % de cultures positives et 64,8 % de cultures négatives. Elles donnent donc plus de cultures positives que les fluorescences négatives et même que les Ziehl-Neelsen négatifs. Elles sont, par conséquent, réellement douteuses. Mais, pour des raisons de fidélité, il ne peut être question de considérer ces cas comme positifs, puisqu'ils ne donnent une culture positive que dans 24,3 % des cas. Aussi les avons-nous confondus dans notre travail avec les fluorescences négatives.

2º - Fidélité des fluorescences positives

a) Etude qualitative

Une autre manière d'avoir une idée de la fidélité de la microscopie en fluorescence pour la recherche du bacille tuberculeux est de vérifier si à toute fluorescence positive correspond une culture positive, d'une part, et de comparer les résultats obtenus avec ceux que donne :, dans les mêmes conditions, la méthode de Ziehl-Neelsen, d'autre part.

Le tableau nº 8 expose la fréquence des cultures positives et des cultures négatives, des échantillons positifs en fluorescence d'abord, des échantillons positifs au Ziehl ensuite.

Tableau nº 8 - Résultats de la culture des échantillons positifs en fluorescence et des échantillons positifs au Ziehl

Examens directs	Total	Culture (+)		Culture (-)		Culture contaminée	
		Nb	%	Nb	%	Nb	%
FL (+)	242	I92	79,3	37	I5,3	I3	5,4
ZN (+)	I30	II5	88,4	10	7,7	5	3,9

Nous constatons que 242 prélèvements positifs en fluorescence donnent 79,3 % de cultures positives et 15,3 % de cultures négatives, alors que les 130 prélèvements au Ziehl-Neelsen donnent 88,4 % de cultures positives et 7,7 % de cultures négatives. Les discordances entre examens optiques et culture sont donc flagrantes. Toutefois il semble que le Ziehl-Neelsen soit moins infidèle que la fluorescence et que cette dernière expose plus souvent à des résultats faussement positifs.

On peut tenter de préciser les résultats apportés par le tableau nº 8 en étudiant le résultat de la culture lorsque fluorescence et Ziehl sont tous les deux négatifs, lorsque la fluorescence est négative et le Ziehl positif, lorsque la fluorescence est positive et le Ziehl négatif et finalement, lorsque fluorescence et Ziehl sont tous les deux positifs (tableau nº 9)

Tableau nº 9 - Résultats de la culture des échantillons ayant donné des résultats concordants et discordants aux deux examens microscopiques

	Total	Cultures positives		Cultures négatives		Cultures contaminées	
		N	%	N	%	N	%
Fluor. - Ziehl -	I000	72	7,2	806	80,6	I22	I2,2
Fluor. - Zhiel +	I0	1	10	4	40	5	50
Fluor. + Zhiel -	I22	9	7,2	31	25,4	82	67,2
Ziehl + Fluor.+	I20	4	3,2	6	5	II0	9I,6

On constate que 1000 échantillons négatifs à la fluorescence et au Ziehl ont donné 80,6 % de cultures négatives. 10 autres, négatifs à la fluorescence mais positifs au Ziehl, ont donné 4 cultures négatives. 122 positifs à la fluorescence et négatifs au Ziehl ont donné 25,4 % de cultures négatives tandis que I20 échantillons positifs aux deux méthodes d'examen ont encore donné 5 % de cultures négatives.

Si les discordances entre examen optique et culture ne se manifestaient que dans les cas " fluorescence positive - Ziehl négatif ", on serait en droit de mettre fortement en doute la fluorescence, et la

fluorescence seule. Or, il n'en est rien puisque les discordances existent même lorsque Ziehl et Fluorescence sont positifs.

Il est donc très vraisemblable qu'un facteur autre que la technique de fluorescence doit être en cause. A ce sujet, une indication nous est donnée par le fait qu'il y a 25,4 % de cultures négatives lorsque les échantillons sont " fluorescence positive - Ziehl négatif " et seulement 5 % lorsqu'ils sont " fluorescence positive - Ziehl positif ". En effet, dans le premier cas, il s'agit vraisemblablement d'échantillons paucibacillaires puisque le Ziehl est négatif alors que la fluorescence, plus sensible, est positive et, dans le deuxième cas, d'échantillons plus riches en bacilles. La richesse en bacilles des échantillons est peut-être en cause. C'est ce que nous allons tenter de vérifier maintenant.

b) Etude quantitative

Nous venons de montrer, d'une manière globale, qu'il existait des discordances aussi bien entre méthode de Ziehl et culture qu'entre microscopie en fluorescence et culture : 37 cas positifs en fluorescence sont négatifs en culture, et 10 cas positifs au Ziehl-Neelsen sont également négatifs en culture.

Les tableaux 10 et 11 nous permettent de savoir pour quelle richesse en bacilles des frottis on rencon-

tre, le plus souvent, une culture négative.

Avec la méthode en fluorescence (tableau nº 10) 1010 prélèvements négatifs donnent 810 cultures négatives et 127 cultures positives.

Tableau nº 10 - Résultats de la culture en fonction de la richesse en bacilles des échantillons examinés en fluorescence

Fluorescence	Total	Cultures positives		Cultures négatives		Cultures contaminées	
		N	%	N	%	N	%
0	1010	127	12,6	810	80,2	73	7,2
1 à 9 BAAR par lame	48	28	58,3	18	37,5	2	4,2
+ de 10/ lame et - de 1/champ	43	31	72,2	11	25,5	1	2,3
1 à 9 / champ	86	71	81,2	7	8,1	8	9,3
10 à 99 / champ	31	28	90,3	1	3,2	2	6,4
100 et plus par champ	34	34	100	0		0	
Total	1252	319	25,5	847	67,6	86	6,9

Puis, au fur et à mesure que le nombre de BAAR découvert sur la préparation augmente, la fréquence de cultures positives augmente parallèlement mais n'atteint 100 % des cas que lorsqu'il y a plus de 100 BAAR par champ microscopique. Elle est respectivement de : 58,3 %, de 72,2 %, de 81,2 % et de 90,3 % lorsque la

fluorescence passe de 1 à 9 BAAR sur toute la lame à 10 à 99 BAAR par champ.

Donc, les discordances entre fluorescence et culture sont d'autant plus fréquentes que le nombre de bacilles vus en fluorescence est plus faible. On pourrait en conclure, au premier abord, que la fluorescence est une méthode d'investigation microscopique infidèle. Mais une autre explication peut être envisagée: en effet, le fait que la positivité de la culture s'élève régulièrement lorsque croît la positivité de la fluorescence suggère que ces discordances sont dues à des défaillances de la culture et non pas à des positivités par excès de la fluorescence. Il reste à voir maintenant dans quelle mesure les résultats du Ziehl vont confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Le tableau nº 11 apporte les corrélations entre les résultats du Ziehl-Neelsen et ceux de la culture et montre que, mis à part les 1122 prélèvements négatifs au Ziehl qui n'ont donné que 18,2 % de cultures positives, les prélèvements positifs au Ziehl ont donné autour de 85 % de cultures positives, quelle que soit la richesse en BAAR.

Ce pourcentage est du même ordre que celui que l'on obtient avec les prélèvements qui montrent à la fluorescence 1 à 9 bacilles par champ microscopique. Or, comme on l'a vu précédemment, cette richesse en bacilles en fluorescence correspond approximativement à 1 à 9 bacilles sur 100 champs au Ziehl-Neelsen.

Tableau nº 11 - Résultats de la culture en fonction de la richesse en bacilles des échantillons examinés au Ziehl-Neelsen

Ziehl-Neelsen	Total	Cultures positives		Cultures négatives		Cultures contaminées	
		N	%	N	%	N	%
0	II22	204	I8,2	837	74,6	81	7,2
1 à 9 pour loo champs	29	24	82,7	2	6,9	3	10,3
10 à 99 pour loo champs	56	48	85,7	6	I0,7	2	3,6
1 à 9 / champ	30	30	I00	0		0	
10 / champ	15	13	86,7	2	13,3	0	
Total	I252	3I9	25,5	847	67,6	86	6,9

Il existe, par conséquent, une grande analogie dans les taux de positivité à la culture des prélèvements positifs au Ziehl ou positifs à la fluorescence. Cette constatation renforce considérablement l'hypothèse émise précédemment que les discordances entre fluorescence et culture sont essentiellement dûes à des défaillances de la culture.

Le but de notre travail était détudier la sensibilité et la fidélité de la microscopie en fluorescence, dans la recherche du bacille tuberculeux.

Les résultats obtenus avec la fluorescence ont été constamment comparés à ceux obtenus, dans les mêmes conditions, avec la méthode de Ziehl-Neelsen. Il s'avère que la microscopie en fluorescence est sensible et rapide mais qu'elle expose à un nombre important de discordances.

Ces conclusions ne sont pas nouvelles. En effet, tous les travaux portant sur la microscopie en fluorescence dans la recherche du bacille tuberculeux ont signalé l'existence de discordances avec la culture.

Le fait que ces discordances se voient le plus souvent avec les prélèvements pauci-bacillaires, d'une part, et qu'elles existent également avec la méthode de Ziehl-Neelsen, d'autre part, nous pousse à penser qu' il ne s'agit probablement pas d'erreurs par excès de la fluorescence, mais de bacilles typiques visibles au microscope et, pour diverses raisons, non cultivables.

Notre but est de rechercher les causes qui peuvent agir sur la multiplication du bacille tuberculeux en culture. C'est ce que nous allons envisager dans le chapitre suivant consacré à l'analyse des discordances entre la microscopie en fluorescence et la culture.

CHAPITRE III

ANALYSE DES DISCORDANCES ENTRE LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE ET LA CULTURE

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'intervenir pour empêcher la multiplication du bacille tuberculeux. Certains agissent sur le bacille de Koch in vivo : ce sont les antibiotiques. D'autres agissent sur le bacille in vitro, par exemple la durée d'acheminement des prélèvements. En plus de ces causes, nous envisagerons rapidement l'effet que la nature du prélèvement peut avoir sur la négativité en culture des prélèvements positifs en fluorescence.

A - ROLE DU TRAITEMENT

Pour apprécier le rôle du traitement, les malades qui ont fourni des prélèvements positifs en fluorescence ont été séparés en deux lots : les malades déjà traités et les malades non traités.

Chez les malades déjà traités (tableau nº 12) on a 17 % de cultures négatives contre 10,8 % chez les malades non traités.

Tableau nº I2 - Résultats de la culture des prélèvements positifs en fluorescence selon que le malade est ou non traité

aitement	Fluorescence +	Cultures +		Cultures -		Cultures contaminées	
		N	%	N	%	N	%
lades traités	152	117	77	26	I7,1	9	5,9
lades non traités	83	70	84,3	9	10,8	4	4,8
lades traitement indéterminé	7	5	71,4	2	28,6	0	
Total	242	I92	79,3	37	I5,3	13	5,4

Il semble, par conséquent, que le fait d'être sous traitement joue un rôle défavorable sur les résultats de la culture. S'il en est bien ainsi, des résultats sensiblement identiques doivent être retrouvés avec les échantillons positifs au Ziehl-Neelsen. Avec ceux-ci (tableau nº 13) on obtient 7,3 % de cultures négatives losque les malades sont traités et 4,9 % de cultures négatives lorsque les malades ne sont pas traités.

Tableau nº 13 - Résultats de la culture des prélèvements positifs au Ziehl-Neelsen selon que le malade est ou non traité

Traitement	Ziehl +	Cultures +		Cultures -		Cultures contaminées	
		N	%	N	%	N	%
Traités	82	73	89	6	7,3	3	2,1
Non traités	41	38	92,7	2	4,9	1	2,5
Traitement interrompu ou terminé	7	4	57,1	2	28,6	1	14,3
Total	130	115	88,5	10	7,7	5	3,8

Ainsi les résultats obtenus avec les prélèvements positifs au Ziehl-Neelsen confirment ceux obtenus avec les prélèvements positifs en fluorescence.

Pour mieux préciser le rôle du traitement antibiotique sur la négativité de la culture des prélèvements positifs en fluorescence, nous avons analysé en détail les 26 cas de " fluorescence positive - culture

négative " trouvés chez les malades traités et les 9 cas de " fluorescence positive - culture négative " trouvés chez les malades non traités.

Parmi les 26 échantillons provenant de malades traités, 12 ont montré en fluorescence 1 à 9 BAAR sur toute la lame et ont tous été négatifs au Ziehl. 8 échantillons ont montré plus de 10 BAAR sur toute la lame mais moins de 1 BAAR par champ, et ont été négatifs au Ziehl dans 6 cas. 5 prélèvements ont donné de 1 à 9 BAAR par champ en fluorescence et ont été négatifs dans 3 cas au Ziehl. 1 échantillon très positif (plus de 100 BAAR par champ) en fluorescence a été positif au Ziehl. En somme, la fluorescence a été très faiblement positive 12 fois sur les 26 cas " Fluorescence positive - Culture négative " provenant de malades traités.

Les 9 cas " fluorescence positive - culture négative " obtenus chez les malades non traités se répartissent comme suit : 4 fois la richesse bacillaire a été de 1 à 4 BAAR sur toute la lame 1 fois de 5 à 9 BAAR sur toute la lame, 3 fois, elle a été supérieure à 10 BAAR sur toute la lame mais a montré moins de 1 bacille par champ et une fois elle a été de 1 à 9 bacilles par champ. Le Ziehl-Neelsen a été négatif pour tous ces cas.

Par conséquent, dans 5 cas sur 9, la richesse

de la fluorescence a été très faiblement positive. Il reste trois cas dont la richesse bacillaire a été moyenne.

Donc, plus que le seul traitement du malade il semble que c'est la conjonction " traitement et prélèvements paucibacillaires " qui joue un rôle important dans les discordances entre résultats de la microscopie en fluorescence et ceux de la culture.

B - ROLE DE LA DUREE D'ACHEMINEMENT DES PRELEVEMENTS

De nombreuses enquêtes menées essentiellement en Afrique ont tenté de préciser l'influence de la durée d'acheminement des crachats sur la viabilité du bacille de Koch (46,54,57). Dans les enquêtes sur la prévalence de la tuberculose en Afrique, l'O.M.S. a montré que les prélèvements faits en Afrique et mis en culture dans un laboratoire d'Europe étaient souvent perdus par contamination ou donnaient des résultats du type " Ziehl-Neelsen positif - culture négative " (57).

De notre côté, nous avons tenté de voir si le délai écoulé entre le moment où a été fait le prélèvement et le moment où il est ensemencé, jouait un rôle dans les discordances obtenues. Dans ce but, nous avons tout d'abord séparé les échantillons positifs en fluorescence en deux lots : ceux provenant de malades traités et ceux provenant de malades non traités. Dans chaque lot nous avons distingué les prélèvements dont la

durée d'acheminement a été de quelques heures, de 24 heures, de trois à 6 jours et de 7 jours et plus. Le tableau nº 14 montre les résultats des cultures effectuées sur les prélèvements positifs en fluorescence selon la durée de l'acheminement et la nature du traitement.

Tableau nº 14 - Résultats de la culture des prélèvements positifs en fluorescence selon le traitement et la durée de l'acheminement

Nombre de fluorescence +	Durée	Total	Cultures positives N	Cultures positives %	Cultures négatives N	Cultures négatives %	Cultures contaminées N	Cultures contaminées %
Malades traités I52	0 j	48	39	81,3	9	18,7	0	
	1 à 2 j	26	18	69,2	7	26,9	1	3,8
	3 à 6 j	2	2	100	0		0	
	7 j et +	4	2	50	0		2	50
Malades non traités 83	0 j	22	21	95,5	1	4,5	0	
	1 à 2 j	25	23	92	1	4	1	4
	3 à 6 j	9	7	77,7	1	11,1	1	11,1
	7 j et +	3	1	33,3	2	66,6	0	

Pour les échantillons arrivés au laboratoire le jour même où ils ont été prélevés, on obtient 18,7 % de cultures négatives chez les malades traités. Le taux passe à 27 % lorsque les prélèvements arrivent avec 1 à 2 jours de retard. Etant donné le très faible nombre de prélèvements examinés, après une durée d'acheminement supérieure à 3 jours, aucune conclusion valable ne peut être tirée sur l'influence de ce délai.

Lorsque l'on envisage le lot de malades non traités, on constate que le taux de cultures négatives semble augmenter progressivement avec la durée d'acheminement des prélèvements. En effet, le taux de cultures négatives est de 4,5 % pour les échantillons reçus au laboratoire après quelques heures seulement, de 4 % après un délai de 1 à 2 jours, de 11 % après un délai de 3 à 6 jours et de 66 % après un délai de 7 jours ou plus.

Tableau nº 15 - Résultats de la culture des prélèvements positifs en fluorescence selon que le malade est ou non traité et selon la durée d'acheminement des prélèvements

	Durée d'acheminement	Total	Cultures + N	Cultures + %	Cultures - N	Cultures - %	Cultures contaminées N	Cultures contaminées %
Traités	0	48	39	81,3	9	18,7	0	
	1 à 7j	32	22	68,7	7	21,8	3	9,3
Non traités	0	22	21	95,5	1	4,5	0	
	1 à 7j	37	31	83,7	4	10,8	2	5,4

Il semble, par conséquent, que la durée d'acheminement des prélèvements intervienne dans le résultat des cultures. En fait, le nombre des prélèvements ayant une durée d'acheminement de 3 à 7 jours et plus étant très faible, nous avons regroupé, d'une part, les prélèvements examinés le jour même et, d'autre part, ceux qui ont une durée d'acheminement supérieure à 24 heures. Avec les prélèvements de ce deuxième groupe nous obtenons21,8 % de "fluorescence positive - culture négative chez les malades traités et 10,8 % chez les malades non traités. (tableau nº 15) Avec les prélèvements du pre-

mier groupe, les pourcentages correspondants sont respectivement 18,7 % et 4,5 %. Par conséquent, la durée d'acheminement ne peut expliquer que 4,5 % environ des cas des prélèvements " fluorescence positive - culture négative ". C'est approximativement ce taux que certains auteurs ont obtenu (35,50,59).

Mais si 4,5 % des discordances sont imputables à la durée de l'acheminement des prélèvements, il reste à expliquer l'existence des 18 % de cas " fluorescence positive - culture négative " chez les malades traités et de 4 % chez les malades non traités, alors que la durée d'acheminement a été de quelques heures. Dans ce but, nous avons recherché les résultats qu'ils ont donné au Ziehl. Les 9 échantillons provenant de malades traités ont donné 6 cas de Ziehl-Neelsen négatif. Le seul échantillon provenant de malade non traité est lui aussi négatif au Ziehl-Neelsen. Il semble, par conséquent que les cas de "fluorescence positive - culture négative" soient liés à la fois au traitement du malade, à la durée de l'acheminement du prélèvement vers le laboratoire et aussi à la richesse de ces prélèvements en bacilles tuberculeux.

C - ROLE DE LA NATURE DU PRELEVEMENT

Pour savoir dans quelle mesure la nature du prélèvement intervient dans la négativité des cultures des échantillons positifs en fluorescence, nous avons groupé les prélèvements sous trois rubriques : les cra-

chats, les tubages gastriques et les prélèvements divers ; et, de plus, à chaque fois, nous avons séparé les malades traités des malades non traités.

Le tableau nº 16 expose les résultats que nous avons obtenus.

Tableau nº 16 - Résultats de la culture des prélèvements positifs en fluorescence selon leur nature et selon qu'ils proviennent d'un malade traité ou non

Types de prélèvements	Traitement	Total	CULTURES positives + N	%	Négatives - N	%	contaminées N	%
CRACHATS	T	89	75	84,2	10	11,2	4	4,6
	NT	56	47	83,9	7	I2,5	2	2,2
	Total	I45	I22	71,4	17	11,7	6	4,1
TUBAGES GASTRIQUES	T	55	38	69	15	27,2	2	3,6
	NT	21	19	90,4	2	9,5	0	
	Total	76	57	75	17	22,3	2	2,6
DIVERS	T	8	5	62,5	1	12,5	2	25
	NT	6	4	66,6	0		2	33,3
	Total	14	9	64,2	1	7,1	4	28,5

Les crachats positifs en fluorescence ont donné 11,7 % de cultures négatives et les tubages gastriques positifs en fluorescence 22,3 % de cultures négatives. Ces derniers sont donc beaucoup plus souvent responsa-

bles de discordances entre fluorescence et culture. Le taux de culture contaminée est approximativement le même dans les deux cas.

Lorsqu'on analyse en détail le taux de cultures négatives en tenant compte du traitement, on ne constate pour les crachats aucune différence entre les malades traités et les malades non traités : 11, 2 % et 12,5 %. Pour les tubages gastriques, au contraire, le taux de cultures négatives est, chez les malades traités, nettement plus élevé que chez les malades non traités : en effet, ce taux est de 27,2 % chez les malades traités contre 9,5 % chez les malades non traités. La différence constatée dans le taux des cultures négatives est probablement dûe à l'absorption per os des antibiotiques.

oo

oo oo

La question était de savoir dans quelle mesure les 15,3 % de " fluorescence positive - culture négative " sont dûs à des erreurs par excès de la fluorescence ou à des erreurs par défaut de la culture. Au terme de notre travail, il nous parait possible d'y répondre. En effet, nous avons démontré les faits suivants :

1º) - La prise ou non de médicaments antibacillaires joue un rôle indiscutable sur la fréquence de positivité

en culture des prélèvements positifs en fluorescence. On obtient, en effet, 17 % de " fluorescence positive culture négative " chez les malades traités, contre 10,8 % chez les malades non traités. Des constatations parallèles sont faites avec les prélèvements " Ziehl positif - culture négative ".

2º) - La durée d'acheminement des prélèvements joue elle aussi un rôle indiscutable. Lorsque cette durée dépasse 24 heures, le taux de positivité en culture des prélèvements " fluorescence positive - diminue de 4,5 %.

3º) - L'association " traitement + délai d'acheminement supérieur à 24 heures " semble être l'élément déterminant expliquant la plus grande partie des cas de " fluorescence positive - culture négative ". En effet, lorsque le délai d'acheminement est nul on obtient 18 % de prélèvements " fluorescence positive - culture négative " chez des malades traités et 4 % chez les malades non traités.

4º) Les tubages gastriques donnent plus souvent que les crachats des cas de " fluorescence positive - culture négative " lorsqu'ils sont effectués chez les malades traités.

Pour vérifier la nature réellement défavorable de ces facteurs (traitement du malade, délai d'acheminement, nature du prélèvement) nous avons recherché les crachats émis par des sujets n'étant pas sous traitement et examinés le jour même. Parmi eux, 16 seule-

ment étaient " fluorescence positive ". Ces 16 crachats ont donné 15 cultures positives et 1 culture négative.

Tableau nº 17 - Résultats de la culture des 16 crachats positifs en fluorescence pris chez des malades non traités et acheminés en moins de 24 heures.

Fluorescence +	Culture +		Culture -		Culture contaminée	
	N	%	N	%	N	%
16	15	93,7	1	6,2	0	

Le crachat négatif à la culture avait montré en fluorescence plus de 10 BAAR sur toute la lame, mais moins de 1 BAAR par champ. Le Ziehl-Neelsen était négatif. S'agissait-il, dans ce cas, d'une erreur par excès de la fluorescence ? ou d'une erreur, par défaut, de la culture ? La deuxième hypothèse nous parait la bonne car il s'agissait d'un tuberculeux pulmonaire avéré chez lequel un échantillon d'expectoration prélévé 24 heures avant celui que nous avons eu à examiner avait été fortement positif au Ziehl-Neelsen et avait donné une culture positive sur milieu de Lowenstein Jensen. Les bacilles vus au microscope étaient donc, selon toute vraisemblance, des bacilles tuberculeux et l'origine de la discordance, une erreur par défaut de la culture.

CONSEQUENCES PRATIQUES

L'étude que nous avons effectuée sur la valeur de la microscopie en fluorescence comme méthode de recherche du bacille tuberculeux, comparée à celle de la microscopie après coloration de Ziehl-Neelsen et de la culture a abouti à des résultats ambigus.

En effet, nous avons constaté que la microscopie en fluorescence, méthode de lecture 16 fois plus rapide que le Ziehl-Neelsen, était également beaucoup plus sensible puisque sur 319 prélèvements positifs à la culture, 60, 2 % étaient positifs à la fluorescence contre 36 % seulement au Ziehl-Neelsen. Mais nous avons également constaté qu'un fort pourcentage des fluorescences positives (15,3 %) n'étaient pas confirmé par des cultures positives.

L'analyse de ces cas nous a montré que l'effet combiné du traitement antibiotique déjà reçu par le malade, du délai d'acheminement et de la nature du prélèvement (tubage gastrique en particulier) n'expliquait pas parfaitement le fort pourcentage de " fluorescences positives - cultures négatives ".

Pourtant il n'y a aucune raison pour que les résultats que nous avons obtenus soient nettement inférieurs à ceux de HOLST, MITCHISON et RADHAKRISHNA (34) dont nous avons suivi scrupuleusement la méthode de coloration.

Or ceux-ci avec un simple microscope monoculaire et une lampe HBO 74 de luminosité bien moindre que la lampe HBO 200 que nous avons employée obtiennent sur 456 fluorescences positives 3,3 % seulement de cultures négatives.

Deux raisons, peut-être complémentaires, peuvent être avancées pour expliquer une telle différence entre nos constatations et celles de HOLST, MITCHISON et RADHAKRISHNA. La première est que l'équipement utilisé par ces derniers est nettement moins sensible que le nôtre. Moins sensible, il permet moins souvent de mettre en évidence les bacilles lorsque ceux-ci sont en petit nombre. Or c'est justement lorsque les bacilles sont en petit nombre que, dans notre travail, les discordances sont les plus grandes. Un argument en faveur de la moindre sensibilité de l'appareillage employé par HOLST, MITCHISON et RADHAKRISHNA est apporté par le tableau nº 18 qui montre que la fluorescence n'est pas plus souvent positive que le Ziehl dans le travail de HOLST et Coll., alors qu'elle l'est beaucoup plus dans notre travail. S'il en est ainsi, ce pourrait bien être parce que les cas pauci-bacillaires n'ont pas été détectés en fluorescence par HOLST et Coll. et donc que leur appareillage était moins sensible que celui que nous avons employé.

Tableau nº 18 - Comparaison des résultats de la fluorescence et du Ziehl-Neelsen sur les prélèvements positifs en culture obtenus par HOLST et Coll. et par nous-même.

Auteurs	Cultures + Nombre	Fluorescence + %	Ziehl + %
HOLST et Coll.	655	67,3	66,1
Nous-même	319	60,2	36

Mais il peut y avoir une autre raison de la différence de résultats entre le travail de HOLST et Coll. et le nôtre. Cette raison est la suivante : le type de prélèvements examinés est totalement différent dans les deux travaux.

Dans le travail de HOLST et Coll. il s'agissait dans tous les cas de crachats émis sur place et examinés sans délai. Dans 70,9 % des cas, les prélèvements provenaient de malades ne recevant pas de chimiothérapie.

Dans notre travail, il s'agissait de crachats dans 50,4 % des cas seulement. De plus, les prélèvements n'ont jamais été émis sur place et il y a toujours eu un délai d'attente dans des conditions diverses avant qu'ils soient portés au laboratoire. Enfin, dans 38,5 % des cas seulement, les prélèvements provenaient de malades ne recevant pas de chimiothérapie.

Toutes ces conditions défavorables difficiles à définir avec précision ont certainement joué un rôle néfaste sur le taux de positivité des cultures. Ce rôle peut être considéré comme prouvé puisque 7,7 % des prélèvements positifs au Ziehl-Neelsen ont été négatifs en culture. Mais il est impossible à mesurer sans un coefficient important d'incertitude. De ce fait, il nous parait nécessaire de considérer la microscopie en fluorescence comme une méthode de très grand intérêt, mais qui mérite encore, en ce qui concerne son utilisation pratique en Algérie, de faire l'objet d'un travail complémentaire.

Celui-ci, que nous nous proposons de faire, devrait porter uniquement sur des crachats, émis sur le lieu même de l'examen. Si, dans ces conditions, les discordances que nous avons trouvées entre fluorescence et culture s'estompent, on pourra envisager d'étendre cette méthode d'investigation aux laboratoires des hôpitaux et des dispensaires. Si les discordances persistent, il faudra continuer à recommander le classique Ziehl-Neelsen. La revue de la littérature et nos propres résultats nous font pencher en faveur de la première hypothèse. Il reste à vérifier qu'elle est juste.

CONCLUSION

Le but de notre travail a été de déterminer dans quelle mesure on peut, pour la recherche du bacille tuberculeux à l'examen microscopique, remplacer la classique coloration de Ziehl-Neelsen par la coloration à l'auramine. Celle-ci confère aux bacilles une fluorescence jaune lorsqu'on éclaire la préparation par une lumière bleue. Les bacilles fluorescents devenants des batonnets brillants sur fond sombre peuvent être recherchés avec un objectif microscopique de faible grossissement, ce qui facilite et accélère considérablement leur recherche.

L'étude que nous avons menée porte sur 1252 prélèvements provenant, en majorité, des hôpitaux et des dispensaires d'Alger et examinés au laboratoire de l'Institut Pasteur d'Algérie. Sur chacun des prélèvements, deux frottis ont été effectués : le premier coloré par le Ziehl-Neelsen, le deuxième par l'auramine.

Tous ont été ensemencés sur milieu de Lowenstein Jensen.

Sur les 1252 prélèvements, 10,4 % ont été positifs au Ziehl-Neelsen, 19,3 % positifs à la fluorescence et 25,5 % positifs en culture. La microscopie en fluorescence parait donc deux fois plus sensible que la microscopie ordinaire après coloration de Ziehl-Neelsen. Cette plus grande sensibilité est également démontrée lorsque l'on analyse les résultats de l'exa-

men microscopique des 319 prélèvements positifs à la culture : 36 % sont positifs au Ziehl-Neelsen et 60,2 % positifs à la fluorescence. La fluorescence est donc bien deux fois plus souvent positive que le Ziehl-Neelsen.

La fidélité de la microscopie en fluorescence a été mesurée par l'étude des résultats en culture des cas positifs et des cas négatifs à l'examen microscopique : 1010 prélèvements négatifs en fluorescence ont donné 12,6 % de cultures positives. Les 1122 prélèvements négatifs au Ziehl-Neelsen ont donné 18,2 % de cultures positives. La négativité en fluorescence est donc plus fidèle que la négativité au Ziehl-Neelsen.

Il n'en est pas de même en ce qui concerne la positivité. En effet, les 242 prélèvements positifs en fluorescence ont donné 15,3 % de cultures négatives, tandis que les 130 prélèvements positifs au Ziehl-Neelsen ont donné 7,7 % de cultures négatives.

L'analyse des cas positifs en fluorescence et négatifs en culture et des cas positifs au Ziehl Neelsen et négatifs en culture conduit à penser que les discordances constatées sont essentiellement dues à des défaillances de la culture. En effet, ces cas sont d'autant plus fréquents qu'il s'agit de prélèvements ayant attendu plus longtemps avant d'être mis en culture et qu'il s'agit de prélèvements pauci-bacillaires.

Toutefois, il ne nous a pas été possible de démontrer avec certitude que les discordances constatées sont effectivement des défaillances de la culture, et qu'elles sont dues aux conditions dans lesquelles les spécimens examinés ont été prélevés et transportés.

Aussi, il nous parait nécessaire de procéder à un travail complémentaire portant sur des crachats émis sur le lieu même de l'examen par des malades non traités, avant de conseiller l'extension de la microscopie en fluorescence pour la mise en évidence du bacille tuberculeux.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ANDREWS RH. and RAKHAKRISMA S.
A comparaison of two methods of sputum collection in the diagnosis of pulmonary tuberculosis
Tubercle, Lond. (1959) 40 I55

2 - AUGIER J. PRUDHOME RO.
Ecrans liquides adaptés à la microscopie en fluorescence utilisant l'auramine comme fluorochrome.
Annales Institut Pasteur I948, 75,223

3 - AUGIER J.
Technique de recherche du BK à l'aide de la microscopie en fluorescence.
Annales Biologie Clinique I95I, 5-6 323

4 - BACHMANN W. et FINKE L.
Ueber dem Fluorezenzmikroskopischen Nachweiss von Tuberkelbazillen in Gewebe
Deutsch. Med. Woch. I939,38, 1474

5 - BEKKER J.H.
Ueber den Fluorezenzmikroskopischen Nachweiss von Tuberkelbazillen in Sputum.
Zentralbl. Bakt. I I94I, 148
fas. 2-3, 125

6 - BELL WJ. - BROWN P.P.
Fluorescence Microscopy in the laboratory. Diagnosis and Assessment of pulmonary Tuberculosis
" The Central African Journal Of Médecine " 1962, Vol 8 Nº 1, 4

7 - BENNEDSEN J. and LARSEN S.O.
Examination for tubercle Bacilli by fluorescence Microscopy
" Scandinavian Journal of Respiratory Diseases " 1966, 47, 114

8 - BETHOUART J.
La recherche du Bacille Tuberculeux par les méthodes de Ziehl et en Fluorescence
Annales de Biologie clinique, 1957
I0-12, 723

9 - BOGEN E.
Detection of tubercle bacilli fluorescence microscopy.
Am; Rev. Tub. 1941, 44, 267

10 - BOY J.
Application de la fluoroscopie à la recherche de BK en pratique courante
Annales de Biologie clinique I949, 3-4, 109

11 - BOY J.
Différents dispositifs d'éclairage pour l'exament du bacille tuberculeux par fluorescence
Annales de Biologie clinique, 1951 5-6, 328

I2 - BOY J. - ROUZIOUX G.
La recherche du bacille tuberculeux par fluorescence. Réponses aux critiques - Nouvelles améliorations techniques
Annales de Biologie clinique, 1954, 1-2, 89

13 - BRIGGS and JENNISON
Detection of mycobacterium tuberculosis by means of fluorescence microscopy
Tubercle 1947, 9, 189

14 - BRIGGS and JENNISON
Fluorescence microscopy and the modified Z.N. technique
Tubercle 1948, 11, 252

15 - BROWAEYS J.
Recherche de BAAR dans les coupes de tissus par fluorescence sur fond noir
Revue de la Tuberculose, 1953, 710

I6 - CANETTI G. RIST N. et GROSSET J.
Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions
Revue de la Tub. et Pneum. 1963, 27, 217

17 - DABELSTEIN H.
Das Fluoreszenzmikroskop in der laufenden Tuberkulose Diagnostik
Zentralbl. Bakt.I, 1939, 143, 242-46

18 - DEGOMMIER J.
Nouvelle technique de coloration des BK pour la recherche en fluorescence.
Annales Institut Pasteur 1957,92,692

19 - DEGOMMIER J. AUDRIN J.
Utilisation en pratique courante d'une nouvelle méthode de coloration des BK pour la recherche en fluorescence.
Annales Institut Pasteur 1957, 93,413

20 - DEGOMMIER J.
Fluorescence et acido-alcoolo-résistance relative du bacille tuberculeux.
Annales Inst. Pasteur, 1959,96, Nº 6
723-33

21 - FINKE L.
Ueber den Fluoreszenzmikroskopischen Nachweiss von tuberkelbazillen in austrichen und Gewebsschnitten.
Arch. für Hygiene und Bakt. 1940,
123, 381

22 - FREIMAN and MOKOLOFF G.
Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy A comparative evaluation on the fluorescence and Z.N. Méthod in the routine examination of smears for acid-fast-bacilli.
Amer. Rev. Tub. 1943, 48, 435

23 - FRIBOURG - BLANC A.
La recherche des BK par la microscopie en fluorescence.
PM Décembre 1950, 58, nº 80, 1400

24 - GILKERSON SW - KANNER O
Improved Technique of the detection of acid fast bacilli by fluorescence.
Journal bacteriology (USA) 1963, 86
nº 4, 890-1

25 - GRAY D.F.
Detection of smale numbers of mycobacteria in sections bi fluorescence microscopy.
Amer. Revue Tub. I953, 1, 82

26 - GUEBERT Y. POUTREL, BLANCHARD
Contribution à l'étude de la recherche des BAAR en lumière fluorescente.
.Annales de Biologie clinique, I953 10-12, 605

27 - HAEBLER (Von) T. and MURRAY J.F.
Fluorescence microscopy as a routine méthod for the détection of M. Tuberculosis and M. Leprae
South Afr. Med. Journal 1954, 28, nº 3, 45

28 - HAGEMANN P.
Fluoreszmikroskopischen Nachweiss von Leprabaktérien Im Nasenschleim Und Im blut
Dtsch. Med. Wschr. 1937, 63, nº I3 5I4

29 - HAGEMANN P.
Fluoreszenzfarbung von Tuberkelbakterien mit Auramin
Münch. Med. Wochenschrifft 1938 85, nº 28, 1066-69

30 - HEIMSTADT O.
Das Fluoreszenzmikroskop
Z, Wiss, Mikrosk 1911, 28, 330

31 - HAUDUROY P. POSTERNACK J.
La recherche du BK dans les produits pathologiques par la microscopie en fluorescence.
PM. I94I, 76-77, 940

32 - HERRMANN W.
Der Nachweiss von Tuberkelbazillen mit dem fluoreszenzmikroskop
Deutsch Med. Woch. 1938, 64, nº 38 I354

33 - HILLER C.
Fluorostaining of tubercle bacilli
Am. Rev. of Respiratory Dis. I967 95, nº 6, I068

34 - HOLST E. , MITCHISON D.A., RADHAKRISHNA
Examination of smeans for tubercle bacilli by fluorescence microscopy
Indian Journal Medecine Research I959 4-7, 495-499

35 - HONG KONG GOUVERNMENT TUBERCULOSIS SERVICE.BRITISH MEDICAL RESEARCH COUNCIL. COOPERATIVE INVESTIGATION (1964)
Drug-Résistance in Patients with pulmonary tuberculosis présentig at chest clinics in Hong-Kong.
Tubercle (Lond.) 45,77

36 - HOUANG LAY
Eclairage critique pour la recherche des bactéries AAR en fluorescence et par lumière bleue
Ann. Inst. Pasteur Lille 1965,16,55-58

37 - HOUANG LAY
Fluorescence microscopy using a simplified illumination system for the detection of tubercle bacilli
W.H.O. TB Techn.information 67-56

38 - HUGUES G.C.
An improved stain for Fl. Microscopy
Tubercle 1946, 7, 91

39 - JENNISON and MORGAN
Fluorescence Microscopy
Tubercle 1950, 4, 84

40 - JONES W.D. - SAITO H. - KUBICA G.P.
Fluorescent antibody techniques with mycobacteria.
Am. Rev. of Resp. Diseases 1965, 92, nº 2, 255-260

41 - KELLER Ch. J.
Vereinfachter nachweiss von tuberkelbazillen im Fluoreszenzlicht
Münch.Med. Woch. 1938,85, nº 52, 2024

42 - KOCH M.L. - COTE R.A.
Comparaison of fluorescence microscopy with Z.N. stein for demonstration of acid fast bacilli in smeans preparation and tissue sections
Amer.Rev. of Respiratory Disease I965 91, nº 1,283

43 - KUSTER H.
Untersüchung mit dem fluoreszenzmikroskop
Deutsch.Med.Woch. I939, 3, 92

44 - LEHMANN H.
Das Lumineszensmikroskop Seine Grundlagen und Seine Andwendungen
Z. Wiss Mikroskopie 19I3, 30, 4I7

45 - LEVADITI J.C. - PRUDHOMME R. - AUGIER J.
Conditions de visibilité du Mycobacterium tuberculosis à l'aide de la microscopie en fluorescence
C.R.S.B. I948, I42, 637

46 - LEVADITI J.C. - PRUDHOMME R. - AUGIER J.
Comparaison des spectres d'absorption des écrans et des émissions des fluorochromes au cours de la microscopie en fluorescence
Ann. Inst.Pasteur 1948, 75 - 2I7

47 - LIND H.E.
Limitations of fluorescent par detection acid fast bacilli
Amer. J.Clin.Patholog. I949-19-72-75

48 - LUCIEN P. GAUJARD M. OESCHSLIN R.
Notes sur la recherche des BK par la méthode de la fluorescence
Revue de la Tuberculose 1952,
séance du I0.5.52, 573

49 - MATTHAEI E.
Simplified fluorescence microscopy of tubercle bacilli
J. Gen. Microbiologie I950, 4, 393

50 - MITCHISON DA, MB, MRCP, PATH M.C.
Examination of sputum by smean and culture in casefinding
XIX International Tuberculosis Conférence, Amsterdam 1967

51 - MULLER G.
Beitrag zum nachweiss der tuberkelbazillen in fluoreszenzmikroskop
Münch.Med.Woch.1943, 52-53, 747

52 - NABONNE A.
Ultramicroscope par contraste de fluorescence.
Annales de Biologie Clinique 1951, 10-11-12, 558

53 - NABONNE A.
Ultramicroscopie en fluorescence - Appareillage et indications.
Annales de Biologie clinique 1953 10-12, 599

54 - NEEDHAM G.M.
Comparative efficacy of direct microscopy (TWO Methods) and cultures in the diagnostis of tuberculosis
Stoff Meetingd of the Mayo Clinic 1957, 132, 1

55 - OSCARSSON P.N.
Zur frage des Xertes der Fluoreszenzmikroskopie für den Nachweiss von Tuberkelbazillen in Sputum
Acta Med.Scand. 1941, 108, 240

56 - PADMANABHA Rao K., NAIR S., COBBOLD N. and NAGANATHAN N.
Some opérational factors influencing the utility of culture examination in the diagnosis of pulmonary tuberculosis
Bull. Org. Mond. Santé 1966,34, 589

57 - PARROT R. et AUGIER J.
Etude de la spécificité de la microscopie en fluorescence dans la recherche des bacilles acido-alcoolo-résistants.
Revue de la Tuberculose et de Pneumologie, Paris 1967, 31, nº 4, 511-516

58 - RICHARDS O., KLINE E. and LEACH E.
Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy
Amer. Rev.Tub. 1941, 44,255

59 - SULA L., SUNDARESAN T.K. and LANGEROVA M.
Effects of storage and transport on the cultivability of mycobacteria
Bull. O.M.S. 1960, 23, 635

60 - TUBERCULOSIS CHEMOTHERAPY CENTRE, MADRAS
A concurrent comparaison of Home and sanatorium treatment of pulmonary tuberculosis in South India (1959)
Bull. W.H.O. 21, 51

61 - VERGEZ R.
La fluorescence dans la recherche du BK
Revue de la Tuberculose 1946, 10, nº 3,4, 191

62 - WEISER L., SPROAT E.F., HAKES J.D., MORSE W.L.
Fluorochrome staining of mycobacteria
Amer.Journ. Clin.Path. 1966, 46 nº 5, 587

63 - WILSON
Fluorescence microscopy in examination of smeans for mycobacterium tuberculosis
Ann. Rev. Tuberc. 1952, 6, 709

64 - ZIMMERMANN W.
Beitrag zum fluoreszenzmikroskopischen nachweiss von Bakterien
Zeit. für Hygiene und Infektion 1940 122, 684

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION..... 1

PRINCIPE

- de la fluorescence 3
- du microscope à fluorescence ... 4
- conditions d'utilisation de la microscopie en fluorescence 6

HISTORIQUE I2

CHAPITRE I

MATERIEL et METHODES

- le microscope I8
- les prélèvements 20
- la coloration de Ziehl-Neelsen . 21
- la coloration à l'auramine 22
- examen microscopique des lames colorées par le Z.N. 23
- examen microscopique des lames colorées par l'auramine 24
- culture sur milieu de Lowenstein Jensen 25
- tests de résistance aux A.T.B. 26

CHAPITRE II

RESULTATS

- résultats globaux 27

- étude de la sensibilité de la microscopie en fluorescence 28

- étude de la fidélité de la microscopie en fluorescence 34

CHAPITRE III

ANALYSE DES DISCORDANCES ENTRE LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE ET LA CULTURE

- rôle du traitement 44

- rôle de la durée d'acheminement des prélèvements 47

- rôle de la nature des prélèvements 50

CONSEQUENCES PRATIQUES 55

CONCLUSIONS..... 59

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES